

Kristallstruktur
der Sulfandehydrogenase SoxCD
aus *Paracoccus pantotrophus*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Ulrich Zander

Kiel, 2011

Referent: Professor Dr. Axel J. Scheidig
Koreferent: Professor Dr. Joachim Grötzinger

Tag der mündlichen Prüfung: 23.6.2011
Zum Druck genehmigt: 23.6.2011

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde. Ich versichere an Eides statt, dass die Abhandlung nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist und dass ich die Inanspruchnahme fremder Hilfen aufgeführt habe, sowie, dass ich die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommen Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere an Eides statt, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Kiel, den

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben:

Allen Mitgliedern und Ehemaligen der Arbeitsgruppe Strukturbilogie und des ZBM der Universität Kiel, insbesondere Annette, Axel, Monika, Renato, Sebastian, Sonja.

Professor Cornelius Friedrich und seiner ehemaligen Arbeitsgruppe der TU Dortmund für die Bereitstellung des SoxCD-Proteins und die Unterstützung in allen biochemischen Fragen.

Daniele DeSanctis (ESRF, Frankreich) für die erfolgreiche Datensammlung.

Santosh Panjikar (EMBL, Hamburg) für Autorickshaw und die nette Hilfestellung.

Meinen Eltern und meiner Ehefrau.

Inhaltsverzeichnis

0.1	Zusammenfassung	IX
0.2	Abstract	XI
0.3	Abkürzungen	XII
1	Einleitung	1
1.1	Prokaryotische Schwefeloxidation	1
1.2	Molybdäenenzyme	5
1.3	Sechs-Elektronen-Transferreaktionen	8
1.4	Kovalente Bindung in enzymatischen Reaktionen	11
1.5	Proteinkristallographie	14
1.5.1	Phasierungsmethoden	16
1.5.2	Qualitätsfaktoren	25
2	Materialien	27
2.1	Organismen	27
2.2	Chemikalien	27
2.3	Puffer und Lösungen	28
2.3.1	SDS-PAGE	28
2.3.2	Kristallisationslösungen	29
2.4	Geräte und Zubehör	29
2.5	Röntgenquellen	30
2.6	Verbrauchsmaterialien Kristallisation	31
2.7	Computerprogramme, Datenbanken	31
3	Methoden	33
3.1	Proteinherstellung	33
3.2	Proteinanalyse	33
3.2.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3.2.2	Analytische Hochdruckchromatographie	34

3.3	Proteinkristallisation	34
3.4	Kristallmontage	35
3.5	Diffractionsexperimente	35
3.5.1	Messung an der Eisen-Absorptionskante	36
3.5.2	Messung eines hochauflösenden nativen Datensatzes	36
3.6	Datenintegration und -skalierung	36
3.7	Kombinierte SAD/MRSAD Phasierung	37
3.8	Erstellen eines hochaufgelösten Proteinmodells	38
4	Ergebnisse	41
4.1	Nomenklatur: SoxCD ₁	41
4.2	Proteinanalyse	42
4.2.1	SDS-Gelelektrophorese	42
4.2.2	Analytische Gelfiltration (HPLC/MALLS)	42
4.3	Proteinkristallisation	45
4.4	Diffraktionsmessungen	45
4.5	Auswertung der Datensätze	48
4.5.1	Bestimmung von Raumgruppe und Kristallpackung	48
4.5.2	Verzwilligung	48
4.6	Strukturlösung	49
4.6.1	Automatisierter Teil: Autorickshaw SAD/MRSAD-Phasierung	49
4.6.2	Strukturlösung, nichtautomatisierter Teil	52
4.7	Qualität des Modells	53
4.8	Bioinformatik/Sequenzanalyse	55
5	Diskussion	61
5.1	Probleme bei der SoxCD ₁ -Strukturaufklärung	61
5.2	Quartärstruktur	66
5.3	Cofaktoren	67
5.4	Tertiärstruktur und Faltungsdomänen	68
5.5	Strukturbasierter Vergleich von SoxCD ₁ mit homologen Proteinen	69
5.6	Interpretation des Proteinmodells	74
5.6.1	SoxYZ-Abhängigkeit	74
5.6.2	Übertragung von sechs Elektronen in einem Reaktionsschritt	76
5.7	Sequenzbasierter Vergleich: Sox-Proteine	78
5.8	Zusammenfassung, Ausblick	87

0.1 Zusammenfassung

Das Enzym Sulfandehydrogenase SoxCD ist ein wichtiger Bestandteil des Schwefeloxidationssystems des fakultativ lithotrophen Bakteriums *Paracoccus pantotrophus*. SoxCD katalysiert eine Oxidationsreaktion innerhalb des Thiosulfat-Reaktionszyklus, bei der sechs Elektronen übertragen werden. SoxCD ist ein $\alpha 2\beta 2$ -Heterotetramer und setzt sich zusammen aus dem molybdänbindenden Protein SoxC und dem hämbindenden Protein SoxD, das aus den beiden cytochromartigen Domänen D₁ und D₂ besteht. SoxCD₁ ist eine enzymatisch voll aktive, verkürzte Version des Wildtyp-Proteins, bei der die D₂-Domäne entfernt wurde. Die Kristallstruktur von SoxCD₁ wurde mit einer Auflösung von 1.33 Å aufgeklärt. Im Gegensatz zu den bekannten homologen Sulfitoxidasen kann SoxCD kein freies Schwefelsubstrat umsetzen. Das Substrat von SoxCD ist SoxYZ-Cys110-Persulfid, das eine Zwischenstufe des Thiosulfat-Oxidationszyklus darstellt. Das c-terminale „*swinging arm*“-Peptid von SoxY, einem Protomer des Transportproteins SoxYZ, bindet das Substrat während dieses Zyklus. Die Kristallstruktur von SoxCD₁ zeigt einen engen Substratbindetrichter, der von der Proteinoberfläche zum Molybdäncofaktor verläuft und von der Aminosäureseitekette Arg98 von SoxD₁ abgeschirmt wird. Aufgrund der vorliegenden Daten wird angenommen, dass die Blockierung des Substratbindetrichters von SoxD₁-Arg98 durch Wechselwirkung mit dem C-Terminus von SoxY aufgehoben wird. Durch die Aufhebung der Blockierung entsteht eine Wechselwirkung der c-terminalen Sequenz VTIGGCGG von SoxY mit dem Substrattunnel in Richtung des Molybdäncofaktors, so dass das Cys110-Persulfid in optimaler Entfernung zu dem Molybdän platziert wird. Die anschließende Oxidation des Schwefelsubstrates wird durch einen nucleophilen Angriff des Persulfidanions an das Molybdän eingeleitet. Die Distanz zwischen Molybdäncofaktor und Hämcofaktor erlaubt die Übertragung von Elektronen. Mit der Struktur von SoxCD₁ sind alle Proteine des Thiosulfat-Oxidationszyklus strukturell charakterisiert. Aufgrund der Kristallqualität war für die erfolgreiche Phasierung der SoxCD₁-Struktur die Verwendung einer hochbrillianten Synchrotron-Strahlenquelle zum Sammeln eines SAD-Datensatzes zwingende Voraussetzung (nach Zander *et al.*, 2011).

0.2 Abstract

The sulfur cycle enzyme sulfane dehydrogenase SoxCD is an essential component of the sulfur oxidation (Sox) enzyme system of *Paracoccus pantotrophus*. SoxCD catalyzes a six-electron oxidation reaction within the Sox cycle. SoxCD is an $\alpha 2\beta 2$ heterotetrameric complex of the molybdenum cofactor-containing SoxC protein and the diheme c-type cytochrome SoxD with the heme domains D₁ and D₂. SoxCD₁ misses the heme-2 domain D₂ and is catalytically as active as SoxCD. The crystal structure of SoxCD₁ was solved at 1.33 Å. The substrate of SoxCD is the outer (sulfane) sulfur of Cys-110-persulfide located at the C-terminal peptide swinging arm of SoxY of the SoxYZ carrier complex. The SoxCD₁ substrate funnel toward the molybdopterin is narrow and partially shielded by side-chain residues of SoxD₁. For access of the sulfane-sulfur of SoxY-Cys-110 persulfide we propose that (i) the blockage by SoxD-Arg-98 is opened via interaction with the C terminus of SoxY and (ii) the C-terminal peptide VTIGGCGG of SoxY provides interactions with the entrance path such that the cysteine-bound persulfide is optimally positioned near the molybdenum atom. The subsequent oxidation reactions of the sulfane-sulfur are initiated by the nucleophilic attack of the persulfide anion on the molybdenum atom that is, in turn, reduced. The close proximity of heme-1 to the molybdopterin allows easy acceptance of the electrons. Because SoxYZ, SoxXA, and SoxB are already structurally characterized, with SoxCD₁ the structures of all key enzymes of the Sox cycle are known with atomic resolution (from: Zander *et al.*, 2011).

0.3 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACP	Acyl-Carrierprotein
ADP	Adenosindiphosphat
aNIR	assimilatorische Nitratreduktase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aSIR	assimilatorische Sulfitreduktase
ATP	Adenosintriphosphat
BESSY	Berliner Synchrotron
BSA	Rinderserumalbumin
CC	Korrelationskoeffizient
CCD	<i>charge coupled device</i>
CoA	Coenzym A
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMBL	<i>European Molecular Biology Lab</i>
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
HPLC	Hochdruck-Chromatographie
kDa	Kilodalton
MAD	<i>multiple wavelength anomalous diffraction</i>
MALLS	Multiangulare Laser-Lichtstreuung
MIR	<i>multiple isomorphous replacement</i>
MPEG	Polyethylenglykol-Monomethylether
MR	<i>molecular replacement</i>
MRSAD	<i>molecular replacement and single wavelength anomalous diffraction</i>
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCS	Nichtkristallographische Symmetrie
NrfA	Cytochrom <i>c</i> - Nitritreduktase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	Proteindatenbank
RI	Brechungsindex
RIP	<i>radiation damage induced phasing</i>

SAD	<i>single wavelength anomalous diffraction</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIR	<i>single isomorphous replacement</i>
SIRAS	<i>single isomorphous replacement and anomalous signal</i>
SLS	<i>Swiss Light Source</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
UV	ultraviolett

Aminosäuren: 3 und 1-Buchstabencode

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Selenomethionin	Mse	

1 Einleitung

Neben den gekennzeichneten Zitaten wurden folgende Lehrbücher als Quellen verwendet: Lehninger Biochemistry (Lehninger *et al.*, 2008), Macromolecular Crystallography (Rupp, 2009), X-Ray Crystallography of Biomacromolecules (Messerschmidt, 2006), Principles of Protein X-Ray Crystallography (Drenth, 2007).

1.1 Prokaryotische Schwefeloxidation

Die biologische Oxidation von Schwefel und Schwefelverbindungen ist in der Natur weitverbreitet. Reaktionen dieser Art sind in Gewässern und Böden nachweisbar (Friedrich *et al.*, 2005). In bestimmten extremen Ökosystemen, z.B. hydrothermalen Quellen am Meeresgrund („Black Smokers“) oder schwefelhaltigen heißen Quellen (z.B. im Yellowstone Nationalpark, USA) ist die Oxidation von Schwefelverbindungen die Reaktion, auf der der Energiemetabolismus der dort vorkommenden Prokaryoten basiert, die wiederum die Grundlage der Nahrungskette des jeweiligen Ökosystems darstellen (Kletzin *et al.*, 2004). Höhere Eukaryoten dieser Ökosysteme, z.B. der Riesenröhrenwurm *Riftia pachyptila*, dessen Lebensraum das Umfeld von Hydrothermalquellen im Pazifischen Ozean ist, tragen schwefeloxidierende bakterielle Endosymbionten in ihren Zellen und werden von ihnen mit Energie versorgt (Minic *et al.*, 2001). Die Fähigkeit Schwefelverbindungen zur Energiegewinnung zu oxidieren, ist auf Prokaryoten, also Archaeen und Bakterien beschränkt (Friedrich *et al.*, 2005).

Das fakultativ lithotrophe Alphaproteobakterium *Paracoccus pantotrophus* (Rainey *et al.*, 1999) bietet sich als ein Modellorganismus für die Charakterisierung der prokaryotischen Schwefeloxidation an. Es ist in der Lage, neben Wasserstoff und einer Vielzahl

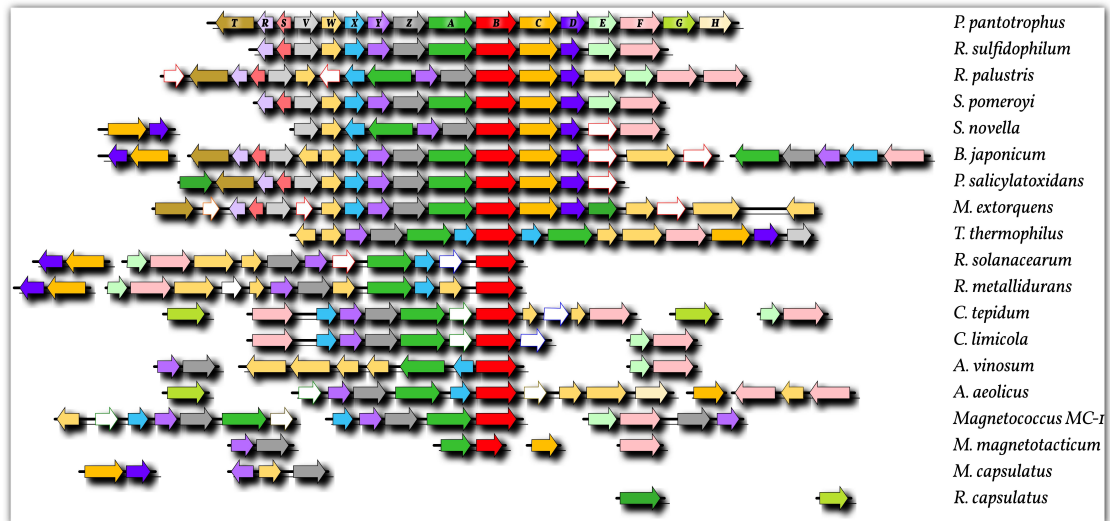


Abb. 1.1: Schematischer Überblick des Sox-Locus von *Paracoccus pantotrophus* und der Gene anderer schwefeloxidierender chemotropher oder phototropher Bakterien. Homologe Gene sind durch identische Farbgebung angezeigt. (Darstellung nach Friedrich *et al.*, 2005)

unterschiedlicher Kohlenstoffverbindungen, zahlreiche Schwefelverbindungen und molekularen Schwefel zur Energiegewinnung zu nutzen.

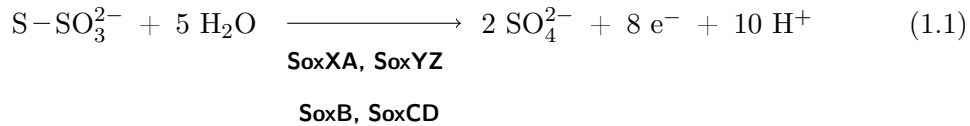
Die Gene, die die für die Schwefeloxidation notwendigen Proteine codieren, sind hochkonserviert. In *Paracoccus pantotrophus* sind sie im sogenannten Sox-Gencluster organisiert, der 2001 erstmals beschrieben wurde (Friedrich *et al.*, 2001). Homologe Gene wurden in verschiedenen schwefeloxidierenden chemotrophen oder phototrophen Prokaryoten gefunden (siehe Abb. 1.1).

Aufgrund dieser Tatsache wird vermutet, dass hier ein grundlegender konservierter Mechanismus der Schwefeloxidation für alle Alphaproteobakterien vorliegt (Friedrich *et al.*, 2005). In Archaeen verläuft der Schwefelmetabolismus nach einem anderen Mechanismus ab (Friedrich *et al.*, 2001), was hier nicht näher behandelt werden soll.

Die Sox-Gene bei *Paracoccus pantotrophus* werden nur dann aktiviert, wenn Schwefelverbindungen als einzige Nahrungsquelle vorliegen. Durch die Kultivierung von *Paracoccus pantotrophus* auf Thiosulfat werden die Gene *soxXYZABCDGHE* induziert. Durch selektive Extraktion der periplasmatischen Proteine wurde gezeigt, dass die Proteinprodukte dieser Gene im periplasmatischen Raum des Bakteriums zu finden sind (Rother *et al.*, 2001a). Die Produkte SoxXA, SoxYZ, SoxB, SoxCD, SoxF, SoxG und SoxH

1.1 Prokaryotische Schwefeloxidation

wurden isoliert. Durch einen *in-vitro*-Assay, der auf der thiosulfatabhängigen Reduktion von Pferdeherz-Cytochrom *c* durch unterschiedliche Kombinationen von Sox-Proteinen beruht, wurden SoxXA, SoxB, SoxYZ und SoxCD als die Komponenten des Systems identifiziert, die im Zusammenspiel Thiosulfat am effektivsten oxidieren (Rother *et al.*, 2001b). Das Reaktionsschema 1.1 zeigt die Summengleichung für diese Reaktion unter Berücksichtigung des Elektronengewinns, der aus der Rate der Cytochrom *c*-Reduktion berechnet wurde.



Der Assay ohne SoxCD ergab eine wesentlich geringere Ausbeute, nämlich nur zwei Elektronen. Basierend auf diesen Feststellungen wurde das Schema einer Reaktion erstellt, das die zyklische Oxidation von Thiosulfat durch die vier Sox-Proteine XA, B, YZ und CD beschreibt, wobei acht Mol Elektronen pro Mol Thiosulfat gewonnen werden. Dieser Thiosulfat-Oxidationszyklus ist in Abb. 1.2 gezeigt.

Die vollständige Oxidation von Thiosulfat beginnt mit der kovalenten Bindung des Substrats durch das tri-Häm-Enzym SoxXA an eine Cysteinseitenkette am C-Terminus von SoxY, einer Untereinheit des heterodimeren Transportproteins SoxYZ (siehe Abb. 1.2 a). Dabei wird SoxY-Cys110-S-Thiosulfat gebildet. Bei dieser ersten oxidativen Transferreaktion werden zwei Elektronen gewonnen. Im zweiten Schritt des Sox-Zyklus wird die terminale Sulfongruppe des Substrats durch die Addition eines Wassermoleküls als Sulfatanion abgespalten, wobei SoxY-Cys110-Persulfid entsteht (siehe Abb. 1.2 b). Dieser Reaktionsschritt wird durch das Dimangan-Enzym SoxB katalysiert. Im folgenden Reaktionsschritt wird durch die Addition von drei Wassermolekülen das SoxY-Cys110-Persulfid-Anion zum SoxY-Cys110-S-Sulfonat-Anion oxidiert (siehe Abb. 1.2 c). Bei diesem Reaktionsschritt, der durch das Molybdodihämo-Enzym SoxCD katalysiert wird, werden sechs Elektronen gewonnen. Im vierten Schritt des Thiosulfat-Oxidationszyklus wird die terminale Sulfongruppe des Substrats als Sulfatanion durch die Addition eines Wassermoleküls abgespalten. Dies wird wieder durch SoxB katalysiert (siehe Abb. 1.2 d). Somit ist das vom Transportprotein SoxYZ gebundene Substratmolekül vollständig metabolisiert und SoxYZ kann für die nächste Runde des Zyklus verwendet werden. Die

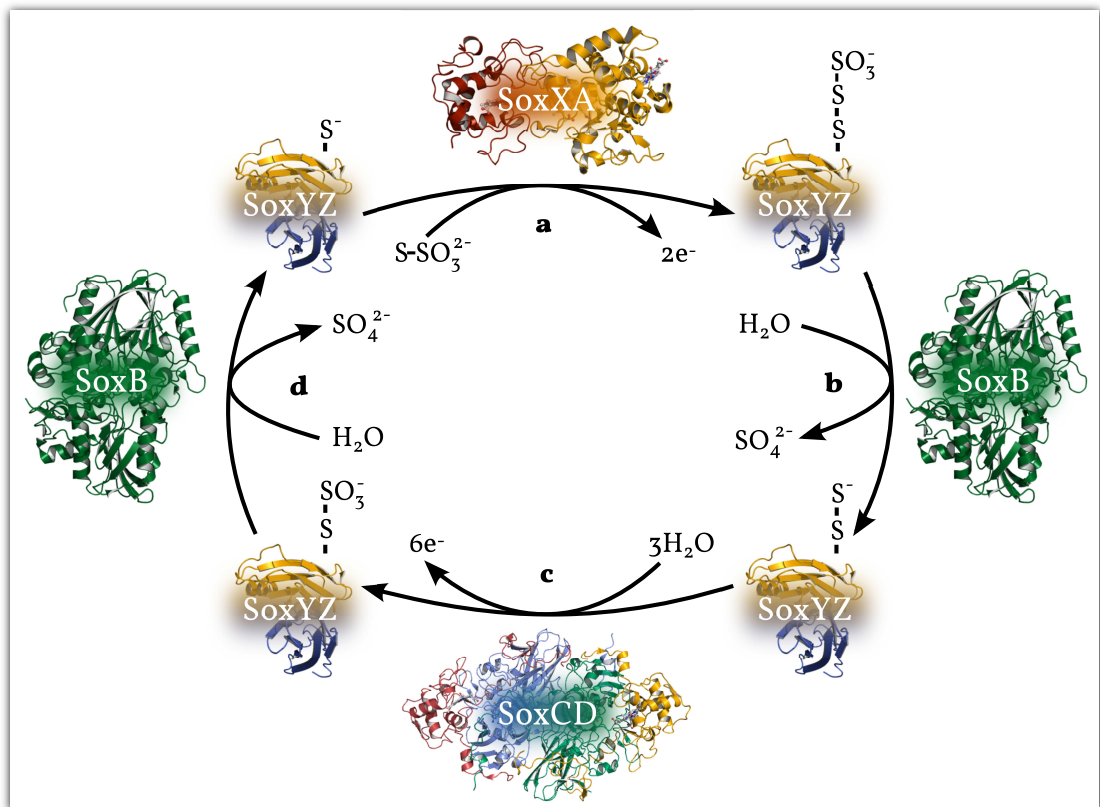


Abb. 1.2: Thiosulfat-Oxidationszyklus von *Paracoccus pantotrophus*. a. Thiosulfat wird von SoxXA an SoxY-Cys110 gebunden. b. SoxB spaltet ein Sulfatanion ab. c. SoxCD oxidiert SoxY-Cys110-Persulfid zu SoxY-Cys110-S-Sulfonat. Bei diesem Reaktionsschritt werden sechs Elektronen gewonnen. d. SoxB spaltet ein zweites Sulfation ab, SoxYZ kann den Zyklus neu durchlaufen. Darstellung nach Friedrich *et al.*, 2001.

Sequenz VTIGGCGG des SoxY-C-Terminus wird als „*Swinging Arm*“ bezeichnet, da dieses Peptid mit den gebundenen Substraten von einem Reaktionszentrum zum anderen „schwingt“.

Dieser Reaktionszyklus zeigt zwei außergewöhnliche Charakteristika: Zum einen die Übertragung von sechs Elektronen in einem Reaktionsschritt (siehe Kapitel 1.3), zum anderen die Funktion von SoxYZ als Transportprotein, das das Substrat der Reaktion kovalent bindet (siehe Kapitel 1.4).

2002 wurde die Kristallstruktur von SoxAX aus *Rhodovulum sulfidophilum* aufgeklärt (Bamford *et al.*, 2002, PDB-Eintrag 1H321). Obwohl das Protein nicht aus *Paracoccus pantotrophus* stammt, kann es in der *in-vitro*-Reaktion das SoxXA aus *Paracoccus pantotrophus* ersetzen. 2005 wurde die Struktur von SoxXA aus *Paracoccus pantotrophus* aufgeklärt (Dambe *et al.*, 2005, PDB-Eintrag 2C1D), 2007 folgte die Strukturaufklärung des Transportproteins SoxYZ (Sauve *et al.*, 2007, PDB-Eintrag 2OX5). 2009 wurde die Struktur von SoxB von *Thermus thermophilus* geklärt, das ebenfalls das aus *Paracoccus pantotrophus* stammende SoxB-Protein in der *in-vitro*-Reaktion ersetzen kann (Sauve *et al.*, 2009, PDB-Eintrag 2OX5). Mit der Veröffentlichung der SoxCD₁-Struktur 2011 (Zander *et al.*, 2011, PDB-Eintrag 2XTS) sind alle Kristallstrukturen der Proteine, die den Thiosulfatzyklus abbilden, aufgeklärt.

1.2 Molybdäenenzyme

Für die meisten Organismen ist Molybdän ein essentielles Spurenelement (Schwarz *et al.*, 2009). Es ist im Reaktionszentrum verschiedener Enzyme, wie Nitrogenasen, Sulfitoxidasen und Xanthinoxidasen, in allen Domänen des Lebens zu finden.

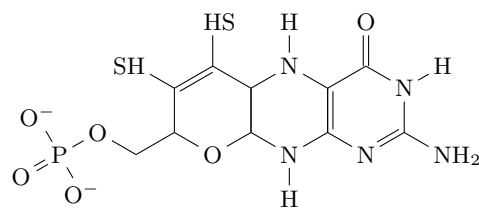


Abb. 1.3: Molybdopterin.

Molybdän kommt in Proteinen ausschließlich cofaktorgebunden vor, wobei es zwei unterschiedlich aufgebaute Arten von molybdänhaltigen Cofaktoren gibt. Die erste Variante basiert auf Molybdopterin. Dieses Molekül besteht aus einem Pyranring, der an einen Pterin-Doppelring gebunden ist. Der Pyranring trägt zusätzlich zwei Thiolate, die als

1 Einleitung

Liganden das Molybdän koordinieren, und eine Alkylphosphatgruppe. Der Name Molybdopterin wird für den Cofaktor ohne gebundenes Metall verwendet (siehe. Abb.1.3). Ist Molybdän gebunden, bezeichnet man den Cofaktor als Molybdäncofactor (Moco, Schwarz *et al.*, 2006).

Aufgrund der chemischen Koordination des Molybdäns können drei Arten von Enzymen mit Pterin-basiertem Molybdäncofaktor unterschieden werden (Hille, 2002). Ist das Molybdän neben den zwei Thiolaten des Molybdopterin von zwei Sauerstoffen und einer Sulfidogruppe koordiniert, zählt man den Cofaktor zum Xanthinoxidase-Typ (z.B. Xanthinoxidase aus *Bos taurus*: Cao *et al.*, 2010, PDB-Eintrag 3NRZ, siehe Abb. 1.4 a). Der Sulfitoxidase-Typ unterscheidet sich hiervon dadurch, dass eine Cysteinseitenkette statt der Sulfidogruppe die fünfte Koordinationsstelle besetzt (z.B. Sulfitoxidase aus *Gallus gallus* Kisker *et al.*, 1997, PDB-Eintrag 1SOX, siehe Abb. 1.4 b). Alle bekannten eukaryotischen Molybdänenzyme gehören zu einer dieser beiden Typen. Der Molybdäncofaktor der DMSO-Reduktase-Klasse unterscheidet sich in seinem Aufbau deutlich: Das Molybdän wird von zwei Molybdopterinmolekülen koordiniert, von denen jedes ein Guanosin-Monophosphat statt der Alkylphosphatgruppe trägt (Mo-bis-MPT-Guanin-Dinukleotid-Cofaktor, z.B. DMSO-Reduktase aus *Rhodobacter sphaeroides*: Li *et al.*, 2000, PDB-Eintrag 1EU1, siehe Abb. 1.4 c). Die bekannten Pterin-basierten Cofaktoren in Archaeen besitzen Wolfram statt Molybdän und gehören zum DMSOR-Typus (W-bis-MPT-Guanin-Dinucleotid, Schwarz *et al.*, 2009). Die Biosynthese Molybdopterin-basierter Cofaktoren beruht auf einem konservierten Mechanismus, der für Pflanzen (Schwarz *et al.*, 2006), Bakterien (Bevers *et al.*, 2008) und Mensch (Reiss *et al.*, 2003) beschrieben wurde. Man nimmt an, dass die Synthese des Wolfram-Cofaktors in Archaeen ähnlich abläuft (Bevers *et al.*, 2008). Der Eisen-Molybdän-Cofaktor (FeMo-Co) stellt die zweite Variante von molybdänhaltigen Cofaktoren dar. Er wurde bislang ausschließlich in bakteriellen Molybdän-Nitrogenasen gefunden. Sein Grundgerüst setzt sich zusammen aus einem 4Fe-3S-Cluster und einem Mo-3Fe-3S-Cluster. Ein Beispiel für ein Protein, das einen solchen FeMo-Cofaktor besitzt, ist die MoFe-Nitrogenase aus *Azotobacter vinelan-*

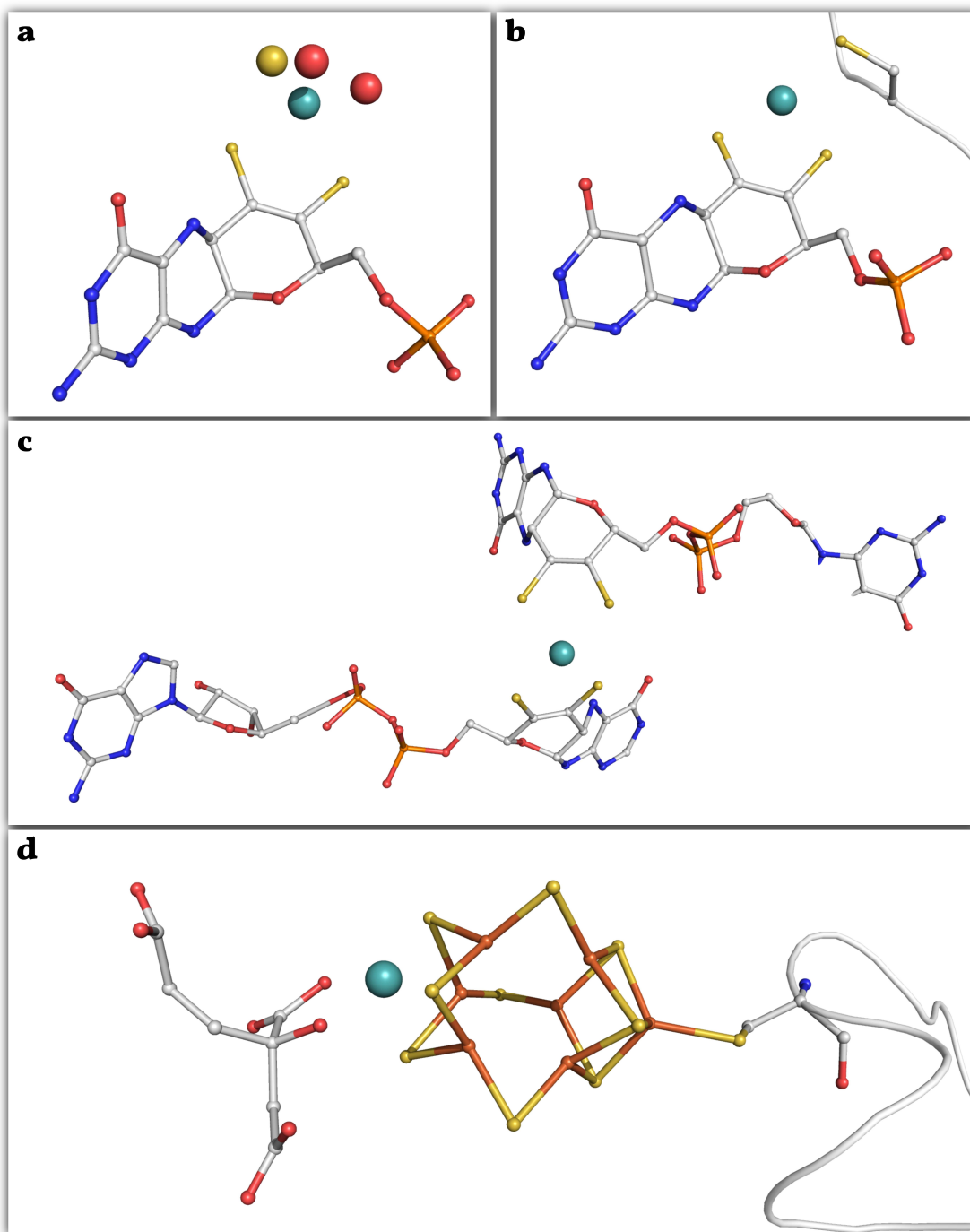


Abb. 1.4: Strukturen der bekannten Molybdän-Cofaktoren. a. Xanthinoxidase-Typ. (Cao *et al.*, 2010, PDB-Eintrag 3NRZ). b. Sulfiteoxidase-Typ (Kisker *et al.*, 1997, PDB-Eintrag 1SOX). c. DMSO-Reduktase-Typ (Li *et al.*, 2000, PDB-Eintrag 1EU1). d. Nitrogenase Fe-S-Molybdän-Cofaktor (Einsle *et al.*, 2002, PDB-Eintrag 1M1N).

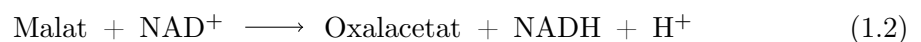
1 Einleitung

dii, deren Kristallstruktur 1997 gelöst wurde (Einsle *et al.*, 2002, PDB-Eintrag 1M1N, siehe Abb. 1.4 d).

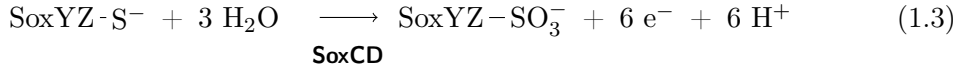
1.3 Sechs-Elektronen-Transferreaktionen

Neben dem Transfer von Phosphatgruppen ist die Übertragung von Elektronen in Redoxreaktionen die wohl wichtigste Stoffwechselreaktion biologischer Systeme. So werden z.B. bei der Verstoffwechselung von Glucose Elektronen gewonnen, die über die Atmungskette auf Sauerstoff übertragen werden. Hierdurch wird eine elektromotorische Triebkraft erzeugt, die z.B. den Protonengradienten aufbaut, mit dessen Hilfe ATP aus ADP und anorganischem Phosphat gebildet wird. Die allgemeine Reaktionsgleichung für eine Redoxreaktion lautet $A + B \longrightarrow A^+ + B^-$, die Enzyme, die Redoxreaktionen katalysieren, werden als Oxidoreduktasen bezeichnet (Enzymklasse EC 1). In biologischen Redoxreaktionen werden neben Elektronen oftmals Protonen übertragen. Die Enzyme, die eine solche Redoxreaktion katalysieren, bezeichnet man als Dehydrogenasen, z.B. die Alkohol-Dehydrogenase (Bosron *et al.*, 1979), die die Umwandlung von Acetaldehyd in Ethanol bei der alkoholischen Gärung katalysiert.

Es gibt vier Möglichkeiten, auf welche Weise Elektronen zwischen Donor und Akzeptor übertragen werden können: Direkt als Elektronen, als Wasserstoffatome, als Hydridatome (bei Reaktionen, die von NAD-abhängigen Dehydrogenasen katalysiert werden), oder durch direkte Sauerstoffbindung. In den meisten biologischen Redoxreaktionen werden ein oder maximal zwei Elektronen in einem Reaktionsschritt übertragen. Ein Beispiel hierfür ist die Oxidation von Malat zu Oxalacetat, wie sie im Zitratzyklus stattfindet (Reaktion 1.2).

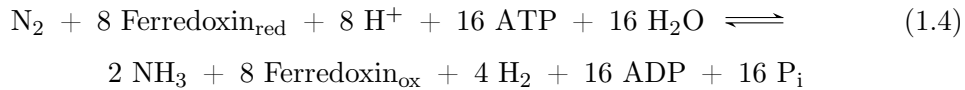


In der gleichen Weise verlaufen die Reaktionen der meisten schwefeloxidierenden Enzyme, z.B. der Sulfitdehydrogenase SorAB aus *Starkeya novella*, die die Umwandlung von Sulfit in Sulfat katalysiert (Kappler *et al.*, 2005). SoxCD dagegen katalysiert eine Reaktion, bei der scheinbar sechs Elektronen auf einmal transferiert werden (Friedrich *et al.*, 2005, siehe Gleichung 1.3, Abb.1.2).



Enzymatische Redoxreaktionen, bei denen mehr als zwei Elektronen transferiert werden, kommen in der Natur vor. Sie sind allerdings, von Ausnahmen wie SoxCD abgesehen, auf drei Arten von Enzymen beschränkt: Nitrogenasen (Ribbe *et al.*, 1997), assimilatorische Sulfitreduktasen (Crane *et al.*, 1996) und assimilatorische Nitritreduktasen (Schnell *et al.*, 2005).

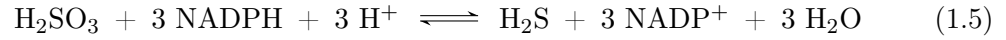
Die Nitrogenase ist ein Enzymkomplex, der in der Lage ist, molekularen Stickstoff zu reduzieren und in eine biologisch verwertbare Form zu überführen (Stickstofffixierung). Der Enzymkomplex kommt in verschiedenen Bakterien, z.B. Cyanobakterien, und Archaeen vor. Der Komplex besteht aus der Dinitrogenase, die einen 8Fe-7S-Eisen-Schwefel-Cluster und einen Eisen-Schwefel-Molybdän-Cofaktor (FeMoCo) enthält, und aus der Dinitrogenase-Reduktase, die einen 4Fe-4S-Eisen-Schwefel-Cluster besitzt. Das Enzym spaltet unter ATP-Verbrauch die Dreifachbindung des Stickstoffs und erzeugt Ammoniak. Gleichung 1.4 zeigt die Reaktion der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* (Einsle *et al.*, 2002, PDB-Eintrag 1M1N, EC 1.18.6.1). Die Elektronen auf der linken Seite der Gleichung werden in Form von reduziertem Ferredoxin bereitgestellt.



Eine andere Enzymarchitektur weist die assimilatorische Sulfitreduktase (aSiR) auf. Dieses Enzym reduziert Sulfit zu Sulfid, welches für den Einbau in schwefelhaltige Aminosäuren oder Cofaktoren bereitgestellt wird. Die prosthetische Gruppe besteht aus einem Sirohäm, das kovalent an einen 4Fe-4S-Eisen-Schwefel-Cluster gebunden ist. Verschiedene aSiR-Enzyme wurden in Bakterien, Pilzen und Pflanzen identifiziert, nicht jedoch in Tieren (Crane *et al.*, 1996). Gleichung 1.5 zeigt die Reaktion der assimilatorischen Sulfitoxi-

1 Einleitung

dase (Crane *et al.*, 1997, PDB-Eintrag 2AOP, EC: 1.8.1.2) des Bakteriums *Escherichia coli*, bei der sechs Elektronen übertragen werden.



Die assimilatorische Nitritreduktase (aNiR), die Nitrit zu Ammoniak reduziert und in den wichtigsten Stoffwechselwegen der Stickstofffixierung von Pflanzen, Pilzen und Bakterien vorkommt, zeigt große Ähnlichkeiten zu der assimilatorischen Sulfitoxidase in Bezug auf Cofaktoren und Primärsequenz. Sie besitzt ebenfalls ein Sirohäm und einen 4Fe-4S-Eisen-Schwefel-Cluster als prosthetische Gruppe. Gleichung 1.6 zeigt die Reaktion des NiRA-Proteins aus *Mycobacterium tuberculosis* (Schnell *et al.*, 2005, PDB-Eintrag 1ZJ8 EC 1.7.7.1).



Das Multi-Häm-Enzym Cytochrom *c*-Nitritreduktase, das in zahlreichen Bakterien vorkommt, katalysiert eine ähnliche Reaktion, allerdings ist der Elektronendonator reduziertes Cytochrom *c* anstelle von Ferredoxin. Gleichung 1.7 zeigt die Reaktion, die von der Cytochrom *c*-Nitritreduktase NrfA aus *Desulfovibrio desulfuricans* (Cunha *et al.*, 2003, PDB-Eintrag 1OAH, EC 1.7.2.2,) katalysiert wird.



Alle Mitglieder der drei genannten Enzymklassen katalysieren Reaktionen nach den Reaktionsgleichungen 1.4, 1.5 und 1.6 bzw. 1.7. SoxCD dagegen nimmt in der Enzymklasse der Schwefel-Oxidoreduktasen durch den Reaktionsmechanismus, bei dem sechs Elektronen übertragen werden, eine Sonderstellung ein.

1.4 Kovalente Bindung in enzymatischen Reaktionen

Die kovalente Bindung eines Substrats durch das katalysierende Enzym oder einen Cofaktor ist ein üblicher Mechanismus enzymatischer Reaktionen. Bei der Hydrolyse von Phosphorsäure-Tyrosinesterbindungen, die durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen katalysiert werden, wird z.B. durch eine nucleophil wirkende Aminosäure-Seitenkette ein Phosphoenzym-Zwischenprodukt gebildet, das im nächsten Schritt durch Wasser gespalten wird (Zhang, 2003). Ein weiteres Beispiel hierfür ist die Reaktion der Transaminase, die die Übertragung von Aminogruppen katalysiert. Zunächst wird eine kovalente Bindung zwischen der zu übertragenden Aminosäure und Pyridoxalphosphat, dem Cofaktor der Transaminase, aufgebaut. Nach der Übertragung der Aminogruppe wird die kovalente Bindung wieder gelöst (Lowe *et al.*, 1985).

Im Thiosulfat-Oxidationszyklus von *Paracoccus pantotrophus* wird Thiosulfat kovalent an das nicht enzymatisch aktive SoxYZ gebunden. Hierbei handelt es sich nicht um eine kovalente Katalyse: Durch SoxXA wird SoxY-Cys110-S-Thiosulfat gebildet, das als Substrat für den Rest der Reaktion dient (Friedrich *et al.*, 2001). Es gibt in der Natur neben zahlreichen Substrattransportproteinen unterschiedlicher Art nur wenige, die ähnlich wie SoxYZ im Thiosulfat-Oxidationszyklus direkt an der enzymatischen Reaktion teilnehmen. Ein Beispiel hierfür sind Biotin-abhängige Carboxylasen, z.B. Pyruvatcarboxylase (Jitrapakdee *et al.*, 2008), Acetyl-CoA-Carboxylase (Tanabe *et al.*, 1981), 3-Methyl-Crotonyl-Carboxylase (Diez *et al.*, 1994) und Propionyl-CoA-Carboxylase (Rodriguez-Pombo *et al.*, 2005), die in Pilzen, Bakterien und Tieren vorkommen (Attwood, 1995). Die Pyruvatcarboxylase, die im ersten Schritt der Gluconeogenese die Umwandlung von Pyruvat zu Oxalacetat katalysiert, ist ein dimerer Komplex aus einer ATP-Bindedomäne und einer Biotin-Bindedomäne. Die Gesamtreaktion (Gleichung 1.8) dieses Enzyms (Xiang *et al.*, 2008, EC 6.4.1.1) besteht aus zwei Teilreaktionen, die jeweils an einer Domäne des Enzymkomplexes katalysiert werden. Im ersten Schritt wird CO₂, das in Form von Hydrogencarbonat vorliegt, unter ATP-Verbrauch kovalent an Biotin gebunden (Gleichung 1.9). Im zweiten Schritt wird die gebundene Carboxylgruppe auf Pyruvat übertragen, wobei Oxalacetat gebildet wird (Gleichung 1.10, Attwood, 1995). Das Biotin, an das die Carboxylgruppe im ersten Schritt der Reaktion kovalent gebunden wird, dient als beweglicher Transporter zwischen den beiden Domänen des Enzyms.

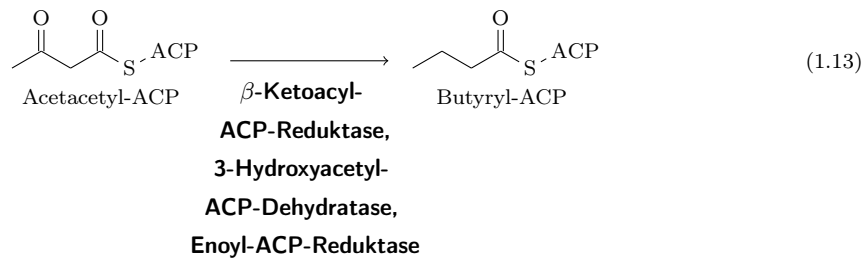
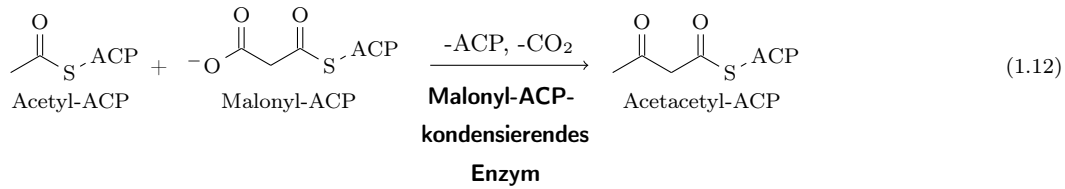
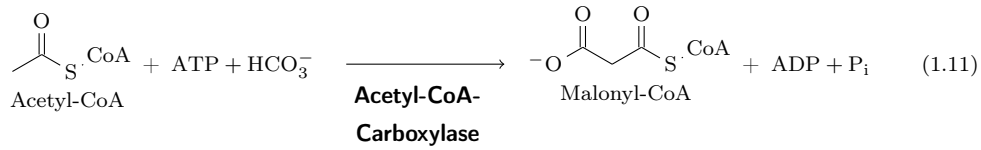
1 Einleitung



Ein weiteres Beispiel für ein Transportprotein, das selbst keine katalytische Aktivität zeigt und mit mehreren Enzymen interagiert, ist das Acyl-Transportprotein (Acyl Carrier Protein, ACP), das ein wichtiger Bestandteil der Fettsäuresynthese und der TypII-Polyketidsynthese ist (Chan *et al.*, 2010). Der in *Escherichia coli* vorkommende BioC-BioH-Stoffwechselweg nutzt das Acyl-Transportprotein und den restlichen Fettsäuresynthetasekomplex für die Synthese von Pimeloyl-CoA, einem Vorläufermolekül von Biotin (Lin *et al.*, 2011).

Im ersten Schritt der Fettsäuresynthese wird Acetyl-CoA unter ATP-Verbrauch zu Malonyl-CoA carboxyliert (Gleichung 1.11), das im nächsten Schritt kovalent an das Acyl-Transportprotein des Fettsäuresynthetase-Multienzymkomplex gebunden wird. Durch die Reaktion von Acetyl-ACP und Malonyl-ACP sowie der anschließenden Reduktion und Dehydratation wird die Kettenverlängerung der entstehenden Fettsäure eingeleitet (Gleichung 1.12, 1.13). Das Acyl-Transportprotein besitzt 4'-Phosphopanthein als prosthetische Gruppe, an die das jeweilige Substrat kovalent gebunden wird. Ähnlich wie bei SoxYZ geht man davon aus, dass das 4'-Phosphopanthein als flexibler „Arm“ die Intermediate der Reaktion zwischen den verschiedenen aktiven Zentren des Fettsäuresynthetasekomplexes bewegt.

1.4 Kovalente Bindung in enzymatischen Reaktionen



1.5 Proteinkristallographie

In einem Röntgendiffraktionsexperiment zur Strukturaufklärung von Makromolekülen wird ein Einkristall mit einem sehr intensiven, monochromatischen Röntgenstrahl bestrahlt. Geeignete Strahlungsquellen für die Proteinkristallographie sind Synchrotrons. In diesen werden Elektronen oder Positronen auf der Kreisbahn eines Speicherrings auf relativistische Geschwindigkeiten beschleunigt. Durch starke Magnetfelder von Insertionseinheiten (*insertion devices: bending magnet, wiggler, undulator*) wird der Elektronenstrahl abgelenkt, wodurch Röntgenstrahlung entsteht. Durch die waagerechte Beschleunigung der Elektronen sind die erzeugten Röntgenstrahlen horizontal polarisiert, außerdem sind sie hochparallel und sehr intensiv. Durch den Einsatz von Gittermonochromatoren ist es möglich, die Wellenlänge der Synchrotron-Röntgenstrahlung zu variieren. Weitere Strahlungsquellen für die Proteinkristallographie sind Röntgeneratoren mit Kupferanoden, die Cu-K $_{\alpha}$ -Strahlung mit einer festen Wellenlänge von 1.54 Å und geringerer Intensität als Synchrotronstrahlung erzeugen.

Die Wechselwirkung von Röntgenstrahlung und Elektronen ist schwach: ca. 99 % der Photonen passieren den Kristall ohne Interaktion, der verbleibende Anteil wird aufgrund der Wechselwirkung mit den Elektronenhüllen der Proteine, aus denen das Kristallgitter aufgebaut ist, gebeugt. Durch Interferenz aller gebeugten Strahlen kommt es zu diskreten Beugungsreflexen. Die Position der Beugungsreflexe sowie deren Intensität $I_{h,k,l}$ wird gemessen, woraus der Betrag des Strukturfaktors \vec{F} direkt bestimmt werden kann (Gleichung 1.14).

$$I_{h,k,l} = |\vec{F}_{h,k,l}|^2 \cdot LP \cdot A \quad (1.14)$$

L, P und A sind Korrekturfaktoren. Der Lorentzfaktor L stellt einen Geometriefaktor dar, der vom experimentellen Aufbau und der Detektorgeometrie bestimmt wird. Der Polarisationsfaktor P geht auf die Tatsache zurück, dass ein Elektron nicht in die Richtung seiner Eigenvibration, die senkrecht zu der Richtung des einfallenden Strahls verläuft, streut. In alle anderen Richtungen ist die Streuintensität abhängig von dem Winkel zwischen der Streurichtung und der Eigenvibration. Sie ist maximal, wenn der Winkel 90° beträgt, also in Richtung des einfallenden Röntgenstrahls. A bezeichnet den

Absorptions-Korrekturfaktor, der Unregelmäßigkeiten des Kristallgitters berücksichtigt. Der Strukturfaktor $\vec{F}_{h,k,l}$ für einen Reflex $I_{h,k,l}$ ist eine komplexe Zahl.

$$\vec{F}_{h,k,l} = \sum_{j=1}^{Atome} f_{(j)} e^{2\pi \cdot i(hx_{(j)} + ky_{(j)} + lz_{(j)})} \quad (1.15)$$

Gleichung 1.15 beschreibt den Strukturfaktor als die Summierung über alle Atomformfaktoren der Atome j mit den fraktionalen Koordinaten x, y , und z . $f_{(j)}$ bezeichnet den atomaren Streufaktor j , der für jedes Element unterschiedlich ist. Aus der Formel des Strukturfaktors lässt sich mit Hilfe der Fourier-Transformation die Elektronendichteverteilungsfunktion berechnen und umgekehrt (Gleichung 1.16).

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \vec{F}_{hkl} e^{-2\pi \cdot i(hx + ky + lz)} \quad (1.16)$$

In dieser Gleichung ist $\rho(xyz)$ die Elektronendichte, \vec{F}_{hkl} ist der Strukturfaktor in der Einheit Elektronen, geteilt durch das Volumen V der Elementarzelle. Sind die Strukturfaktoren bekannt, kann die Elektronendichteverteilung innerhalb der Elementarzelle berechnet werden.

Bei der röntgenkristallographischen Messung kann nur der Betrag des Strukturfaktors $|\vec{F}_{h,k,l}|$ über die gemessene Intensität des Beugungsreflexes direkt bestimmt werden. Der für die Fouriertransformation verwendete komplexe Strukturfaktor benötigt zusätzlich den Phasenwert, siehe Gleichung 1.17:

$$\vec{F}_{hkl} = |\vec{F}_{h,k,l}| \cdot e^{i \cdot \alpha} \quad (1.17)$$

Der Phasenwert eines jeden Beugungsreflexes kann experimentell nicht unmittelbar gemessen werden und geht zunächst verloren. Diese Limitierung wird als das Phasenpro-

1 Einleitung

blem der Kristallographie bezeichnet. Eine andere Darstellung der Formel 1.16 verdeutlicht dies:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |\vec{F}_{hkl}| e^{-2\pi i(hx+ky+lz-\alpha_{hkl})} \quad (1.18)$$

Der unbekannte Phasenanteil α_{hkl} muss daher indirekt oder durch zusätzliche Experimente nachträglich ermittelt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Korrektheit der Phasen wesentlich wichtiger für die Berechnung der Elektronendichte ist als die gemessenen Amplitudenwerte.

1.5.1 Phasierungsmethoden

Isomorpher Ersatz

Isomorpher Ersatz ist historisch gesehen die älteste Phasierungsmethode der Proteinkristallographie (Kendrew *et al.*, 1958). Die ersten makromolekularen Proteinstrukturen (Myoglobin: Kendrew *et al.*, 1958, Hämoglobin: Perutz *et al.*, 1960, Lysozym: Blake *et al.*, 1962) wurden mit dieser Technik gelöst. Sie beruht darauf, dass eine Veränderung in einem Kristall, z.B. die Einfügung von Schweratomen, die Intensitäten des Diffraktionsmusters ändert. Die Strukturfaktoren des Derivatkristalls \vec{F}_{PA} setzen sich aus den Strukturfaktoren der Schweratome \vec{F}_A und denen des Proteins \vec{F}_P zusammen, siehe Gleichung 1.19.

$$\vec{F}_{PA} = \vec{F}_P + \vec{F}_A \quad (1.19)$$

Aus einem Diffraktionsexperiment mit einem nativen Kristall und einem derivatisierten Kristall kann die Substruktur der Schweratompositionen bestimmt werden, woraus wiederum die Phasen der nativen und derivatisierten Strukturfaktoren hergeleitet werden können. Aus diesen Rechnungen resultieren zwei mögliche Werte für die Phasen der Strukturfaktoren (siehe Abb. 1.6). Diese Zweideutigkeit kann beseitigt werden, indem ein zusätzliches Derivat mit einem anderen Schweratom verwendet wird (Multiple isomorphous replacement, MIR) oder durch die Kombination von isomorphem Ersatz und anomaler Diffraktion (SIRAS).

Die Voraussetzung für die Anwendung der genannten Methoden ist die Isomorphie. Hierunter versteht man, dass die Kantenlängen und Winkel der Elementarzellen zweier Kristalle um maximal 1 % voneinander abweichen. Weiterhin darf sich die Orientierung des Moleküls in der Elementarzelle nicht ändern.

Eine moderne Variante des isomorphen Ersatzes ist die Phasierung über induzierte Strahlenschäden im Kristall (radiation damage induced phasing, RIP), der besonders für Proteine mit Disulfidbrücken geeignet ist (Ravelli *et al.*, 2003). Hierbei wird zunächst ein nativer Datensatz eines Kristalls gemessen. Anschließend wird der Kristall mit einem UV-Laser bestrahlt, wodurch strahlungssensitive Bereiche, z.B. Disulfidbrücken, zerstört werden und die lokale Elektronendichte an diesen Stellen massiv verändert wird; man erhält sozusagen einen Derivatkristall. Anschließend wird ein Datensatz des bestrahlten Kristalls gemessen und die isomorphen Differenzen der beiden Messungen bestimmt. Der Vorteil hierbei ist, dass keine Derivatisierung durchgeführt werden muss, und die Messung mit nur einem Kristall abläuft, wodurch das Problem der Isomorphie nicht mehr so stark ins Gewicht fällt. 2003 wurde als eine der ersten Anwendungen dieser Technik die (schon bekannte bekannte) Struktur von Rindertrypsin aufgeklärt (Ravelli *et al.*, 2003, PDB-Eintrag 1N6Y). Ein Beispiel für eine Struktur, die *ab initio* mit RIP gelöst wurde, ist die des humanen Alpha-1-acid-Glykoproteins (Schonfeld *et al.*, 2008, PDB-Eintrag 3KQ0).

Single-wavelength anomalous dispersion SAD

Für den „normalen“ Fall der Thomsonstreuung von Röntgenstrahlen gilt, dass die Elektronen, die in Wechselwirkung mit den einfallenden Wellen treten, zum Oszillieren angeregt werden und in einem elastischen Streuvorgang ihrerseits zum Ausgangspunkt von Kugelwellen werden. Thomsonstreuung tritt auf, wenn die Frequenz des einfallenden Strahls ω im Vergleich zu der natürlichen Absorptionsfrequenz ω_{kn} des streuenden Atoms groß ist. Die Bedingung $\omega \gg \omega_{kn}$ gilt für die leichten Atome in Proteinen (H, C, N, O, S) und verwendete Wellenlängen von 0.5 - 3.5 Å, wohingegen sie für schwerere Atome, z.B. Fe, Hg, Au nicht erfüllt ist. Bei schweren Atomen (viele Elektronen) ist die Annahme, dass sich die inneren Elektronen frei bewegen können, nicht länger richtig. Dies führt dazu, dass der atomare Streufaktor nicht länger als wellenlängenunabhängig betrachtet werden kann, sondern durch die beiden wellenlängenabhängigen Terme $f'_{(\lambda)}$ und $f''_{(\lambda)}$ er-

1 Einleitung

gänzt werden muss. Dieses Phänomen wird als „anomale“ Streuung bezeichnet (Gleichung 1.20).

$$f_{(S,\lambda)} = f_{(S)}^0 + f'_{(\lambda)} + i \cdot f''_{(\lambda)} \quad (1.20)$$

Die Beiträge des anomalen Streufaktors $f'_{(\lambda)}$ und $f''_{(\lambda)}$ sind praktisch unabhängig vom Streuwinkel.

Ist ω gleich der Absorptionsfrequenz ω_{kn} , findet ein Energietransfer und eine Änderung in den Elektronenniveaus statt. Im Gegensatz zu Absorptionsphänomenen mit optischem Licht, die auf die Änderungen der Valenzelektronenzustände zurückgehen, können durch Röntgenstrahlung die Elektronen der inneren Schale beeinflusst werden. Je näher sich ein Elektron am Kern befindet, desto höher ist die benötigte Energie, um es aus seiner Schale herauszulösen, somit absorbieren die inneren Elektronen der K-Schale bei den hohen Energien, die im Bereich der verwendeten Wellenlänge liegen, und die der L- und M-Schalen bei niedrigeren Energien.

Dadurch, dass sich die Beiträge zu dem atomaren Streufaktor abhängig von der Wellenlänge ändern, ergeben sich für die gleichen Reflexe bei unterschiedlichen Wellenlängen unterschiedliche Intensitäten. Dies wird als dispersive Differenz bezeichnet. Als weitere Konsequenz der anomalen Streuung wird die Zentrosymmetrie des Diffraktionsmusters gebrochen.

Reflexe, die durch Inversion durch den Ursprung des reziproken Raumes symmetrieverwandt sind, bezeichnet man als Friedel-Paare. Die Amplitudenwerte eines Friedel-Paares haben den gleichen Betrag, wenn keine anomal streuende Atome vorhanden sind und die Phasenwerte sind unterschiedlich, vgl. Gleichung 1.21.

$$|\vec{F}_{hkl}| = |\vec{F}_{-h-k-l}| \quad (1.21)$$

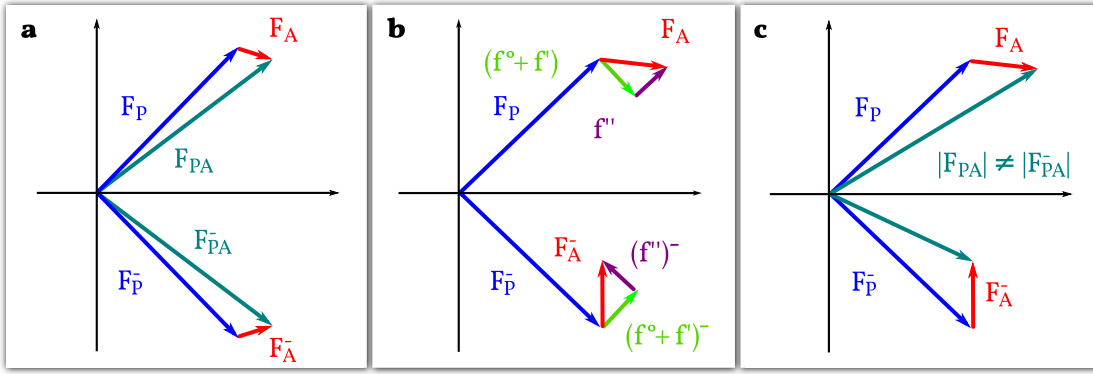


Abb. 1.5: Argand-Diagramm. **a.** Keine anomale Streuung, Friedels Gesetz ist erfüllt. Die Amplitudenbeträge $|F_{PA}|$ und $|F_{PA}^-|$ sind gleich. **b.** Anomaler und dispersiver Effekt an der Absorptionskante. **c.** Resultat der anomalen Diffraktion: Durch die unterschiedlichen Richtungen von $|\vec{F}_A|$ und $|\vec{F}_{A^-}|$ unterscheiden sich die Beträge der Strukturfaktoren eines Bijvoet-Paares: $|\vec{F}_{PA}| \neq |\vec{F}_{PA}^-|$. Darstellung nach Rupp, 2009.

In allen höheren Raumgruppen außer P1 hat jedes Mitglied eines Friedel-Paares zusätzlich symmetrieverwandte Reflexe. Aufgrund der zweizähligen Drehachse in der Raumgruppe P2 gilt für jeden Reflex h, k, l , dass der symmetrieverwandte Reflex $-h, k, -l$ die gleiche Strukturamplitude hat (siehe Gleichung 1.22):

$$|\vec{F}^+| \equiv |\vec{F}_{hkl}| = |\vec{F}_{-hk-l}| \quad |\vec{F}^-| \equiv |\vec{F}_{-h-k-l}| = |\vec{F}_{h-kl}| \quad (1.22)$$

Zwei Reflexe aus je einem der beiden Sets aus Gleichung 1.22 bilden ein Bijvoet-Paar. Ein Friedel-Paar ist also immer auch ein Bijvoet-Paar, aber ein Bijvoet-Paar nicht unbedingt ein Friedel-Paar. Durch die Anwesenheit von anomalen Streuern im Protein kann Friedels Gesetz gebrochen werden. In Abbildung 1.5 ist dargestellt, wie die Anwesenheit eines anomal streuenden Atomes die Phasenwerte verändert. \vec{F}_P stellt die Amplitude der normal streuenden Proteinanteile dar, \vec{F}_A die der anomal streuenden Atome. Abbildung 1.5 a zeigt den Normalfall wie in Gleichung 1.21 beschrieben. Tritt anomale Streuung auf, muss der Streufaktor, wie in Gleichung 1.20 um den anomalen Anteil f'' und den dispersiven Anteil f' erweitert werden.

Der dispersive Beitrag f' und der normale Streufaktor f_S^0 haben die gleichen Phasenwerte. Der anomale Beitrag f'' hat dagegen eine Phasenverschiebung von 90° zu dem dispersiven Beitrag. Hieraus ergibt sich, dass sich die Beträge der Phasenwinkel des anomal streuenden Atoms \vec{F}_A für Bijvoet-Paare unterscheiden (siehe Abb. 1.5 b), woraus sich unterschiedliche Intensitäten für $|\vec{F}_{PA}|$ und $|\vec{F}_{PA}^-|$ ergeben (siehe Abb. 1.5 c).

1 Einleitung

Die Differenz der Amplitudenwerte für $|\vec{F}^+|$ und $|\vec{F}^-|$ wird als Bijvoet-Differenz bezeichnet.

Da der Betrag des zu messenden anomalen Signals im Vergleich zur Gesamtintensität sehr klein ist, ist es sinnvoll, eine Wellenlänge zu wählen, bei der sowohl das anomale als auch das dispersive Signal maximal ist. In der Praxis wird hierfür ein Wellenlängenscan durchgeführt, um die Absorptionskante des gewünschten Elements zu bestimmen, da die theoretischen Werte der Absorptionskanten im Proteinmolekül durch die Proteinumgebung leicht verändert sein können. Der Beitrag des imaginären Anteils zur anomalen Streuung f'' ist proportional zum atomaren Absorptionskoeffizienten μ (siehe Gleichung 1.23) und kann daher direkt aus dem Röntgenfluoreszenzanregungsspektrum bestimmt werden.

$$f''_{(\lambda)} = \frac{mc}{4e^2h} E_{(\lambda)} \mu_{(\lambda)} \quad (1.23)$$

Der Beitrag des realen Anteils f' zur anomalen Streuung kann indirekt aus dem Wellenlängenscan bestimmt werden, indem die Kramer-Kronig-Gleichung erfüllt wird (Gleichung 1.24).

$$f'_{(\lambda)} = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty E' \cdot \frac{f''_{(E')}}{E^2 - E'^2} dE' \quad (1.24)$$

Viele Proteine besitzen im nativen Zustand für anomale Phasierung geeignete Metallzentren, z.B. Fe, Mn, Zn, Cu. Außerdem können Schwefelatome von Methionin- und Cystein-Seitenketten verwendet werden (S-SAD), aufgrund des schwachen anomalen Signals allerdings nur bei sehr guter Kristallqualität. Proteinkristalle können weiterhin mit Elementen wie Ag, Au, Pt, Hg, Ir, Ta derivatisiert werden, und es besteht die Möglichkeit, bei der Proteinherstellung Methionin durch Selenomethionin zu ersetzen und das anomale Signal des Selens zu verwenden.

Ein Problem, das bei der SAD-Phasierung wie auch bei der SIR-Phasierung auftritt, ist die Uneindeutigkeit der Phasenwinkel, wie im Harker-Diagramm dargestellt (siehe Abb. 1.6) Der Strukturfaktor eines Proteins mit bekannter Amplitude \vec{F}_{PA} und unbekannter Phase kann durch einen Kreis mit dem Radius \vec{F}_{PA} in der komplexen Ebene dargestellt werden. Aufgrund des Zusammenhangs $\vec{F}_{PA} = \vec{F}_P + \vec{F}_A$ kann ein zweiter Kreis für die Amplitude \vec{F}_P eingezeichnet werden, dessen Mittelpunkt durch den Betrag und

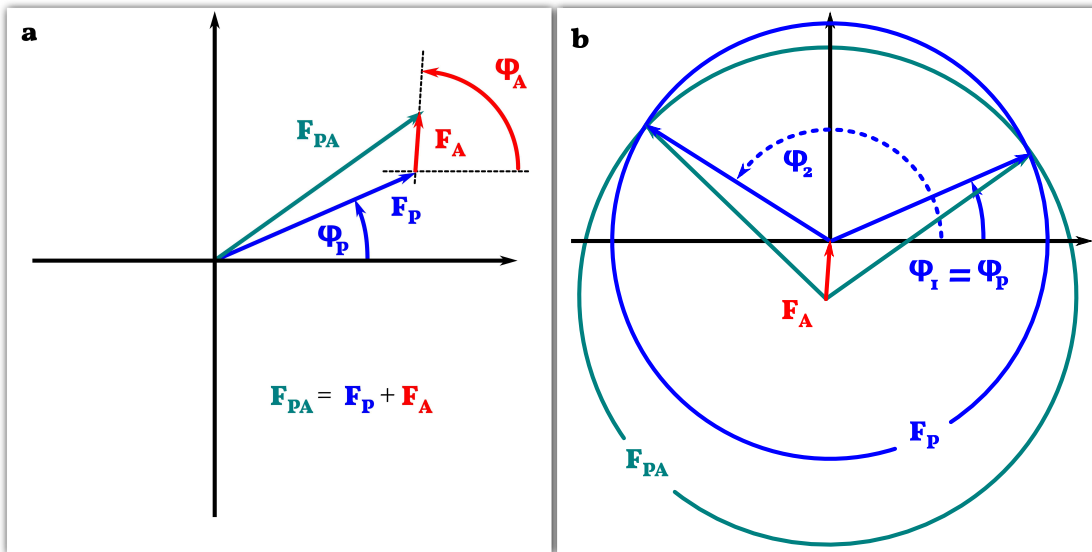


Abb. 1.6: Illustration der Phasenuneindeutigkeit der SAD-Phasierung. a. Der Zusammenhang der komplexen Strukturfaktoren von Protein (F_P), Derivat (F_{PA}) und Schweratomen (F_A). b. Harker-Konstruktion: Aus Differenzdaten kann der komplexe Strukturfaktor der Schweratome F_A bestimmt werden. Für die Phasenwerte des Proteins gibt es zwei mögliche Lösungen, von denen allerdings nur eine korrekt ist. Darstellung nach Rupp, 2009.

die Phase des Schweratomanteils \vec{F}_{PA} bestimmt wird. Aus den beiden Schnittpunkten der Kreise können zwei Phasenwinkel ϕ_1 und ϕ_2 bestimmt werden, von denen allerdings nur einer korrekt ist. Diese Zweideutigkeit bei Phasierung über das anomale Signal kann durch verschiedene Methoden aufgehoben werden, z.B. durch Messung bei verschiedenen Wellenlängen (MAD, Pahler *et al.*, 1990), durch Kombination isomorpher und anomaler Techniken (SIRAS, Skubak *et al.*, 2009), durch Dichtemodifizierung oder durch den speziellen Einsatz direkter Methoden.

Direkte Methoden/Substrukturbestimmung

Direkte Methoden werden üblicherweise bei der Phasenbestimmung in der Kleinmolekülkristallographie verwendet. Sie nutzen statistische Werte, die auf der Tatsache beruhen, dass die streuende Elektronendichte eine positive reelle Zahl darstellt und die Phasen von Gruppen von Reflexen bei vorgegebener Symmetrie feste Werte annehmen bzw. sich zu bestimmten Werten aufaddieren.

1 Einleitung

Mit dieser Methode können die Phasen für Strukturen mit ungefähr 1000 Atomen oder weniger berechnet werden, für größere Moleküle funktioniert das Gleichungssystem nicht mehr. Daher ist es nicht möglich, direkte Methoden für zur Phasierung von Proteinkristallstrukturen zu verwenden. Allerdings werden sie sowohl in isomorphen als auch in anomalen Phasierungsmethoden für die Detektion der Substruktur verwendet.

Die anomalen oder isomorphen Differenzen im Beugungsbild stammen ausschließlich von den verwendeten Schweratomen, deren relative Positionen man als Kristall im Proteinkristall betrachten kann. Man bezeichnet die isoliert betrachtete Anordnung der Schweratome als Substruktur. Da diese Schweratom-Substruktur im Vergleich zur Proteinstruktur relativ wenige Atome enthält, kann die Position der Schweratome mit direkten Methoden oder Patterson-Methoden bestimmt werden. Ausgehend von diesen Positionen werden initiale Phasen für die Diffraktionsdaten generiert, die dann durch weitere Methoden verbessert werden können.

Molekularer Ersatz

Die Verwendung von experimentellen Phasierungsmethoden ist mit gewissen Nachteilen verbunden. Es werden Derivatkristalle benötigt, hergestellt entweder durch Eindiffundieren von Schweratomen in wasserlöslicher Form oder durch Selenomethionin-Markierung bei der Proteinexpression. Auch wenn keine Derivatisierung notwendig ist, z.B. bei intrinsischer SAD-Phasierung über die Schwefelatome, muss das Diffraktionsexperiment mit möglichst hoher Meßgenauigkeit und Redundanz durchgeführt werden.

Molekularer Ersatz (Molecular Replacement, MR) bietet eine Phasierungsmöglichkeit mit nativen Proteinkristallen und einer einfachen, nichtredundanten Datensammlung. Voraussetzung hierfür ist, dass eine Proteinstruktur existiert, die eine ausreichend hohe Homologie zu der aufzuklärenden Struktur besitzt. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass ca. 30 % Sequenzidentität ausreichen, um die Phasen einer unbekannten Proteinstruktur herleiten zu können. Das Prinzip des molekularen Ersatzes ist, dass die Suchstruktur innerhalb der Einheitszelle oder der asymmetrischen Einheit translatiert und rotiert wird, bis die beste Übereinstimmung zwischen den berechneten Diffraktionsdaten des Suchmodells und den experimentellen Daten der unbekannten Struktur gefunden wird.

In der Praxis wird hierfür eine dreidimensionalen Rotationssuche, kombiniert mit einer dreidimensionalen Translationssuche, durchgeführt. Die Grundlage für die in den MR-Programmen verwendeten Suchalgorithmen liefert die Patterson-Funktion.

Die Patterson-Funktion ist eine Autokorrelationsfunktion der Elektronendichte. Sie wird aus den quadrierten Strukturfaktoramplituden berechnet, wobei die Phasenwerte nicht berücksichtigt werden bzw. 0 sind, siehe Gleichung 1.25.

$$\vec{P}(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |\vec{F}_{hkl}|^2 e^{-2\pi i(hu + kv + lw)} \quad (1.25)$$

Um die Patterson-Elementarzelle von der des realen Raumes zu unterscheiden, werden die relativen Koordinaten u , v und w verwendet. Die Elementarzelle des Patterson-Raumes ist genauso groß wie die Elementarzelle des Kristalls der zugehörigen Elektronendichte, allerdings hat die Patterson-Funktion $N(N - 1) + 1$ Maxima im Vergleich zu N Maxima der Elektronendichte. Die Patterson-Funktion ist immer zentrosymmetrisch, da die Vektoren immer in zwei Richtungen verlaufen ($A \rightarrow B$, $B \rightarrow A$), und das Maximum der Funktion liegt am Ursprung (interatomarer Vektor eines Atoms mit sich selbst). Aufgrund der großen Anzahl von Atomen in Proteinmolekülen und der daraus resultierenden Anzahl der Maxima im Patterson-Raum ist die direkte Interpretation nicht möglich.

Der Patterson-Raum besteht aus Distanzvektoren zwischen allen Atompaaren im Kristall, Selbstvektoren (*self vectors*) zwischen äquivalenten symmetrieverwandten Atomen und Kreuzvektoren (*cross-vectors*) zwischen nicht symmetrieverwandten Atomen. Man kann diese durch ihre Beträge unterscheiden: große Distanzen im Patterson-Raum stammen von den intermolekularen Selbstvektoren und kleine Distanzen von intramolekularen Kreuzvektoren. Für die Suche nach der korrekten Orientierung der Zielstruktur im dreidimensionalen Raum werden ausschließlich die intramolekularen Kreuzvektoren benötigt, da die intermolekularen Selbstvektoren vom Aufbau der Kristallpackung bestimmt werden.

Für die Rotationssuche wird eine Pattersonkarte für das Homologiemodell berechnet, die nur intramolekulare Vektoren enthält. Um die Orientierung des Zielmoleküls zu bestimmen, wird diese Vektorkarte in kleinen Schritten rotiert, bis die bestmögliche Überein-

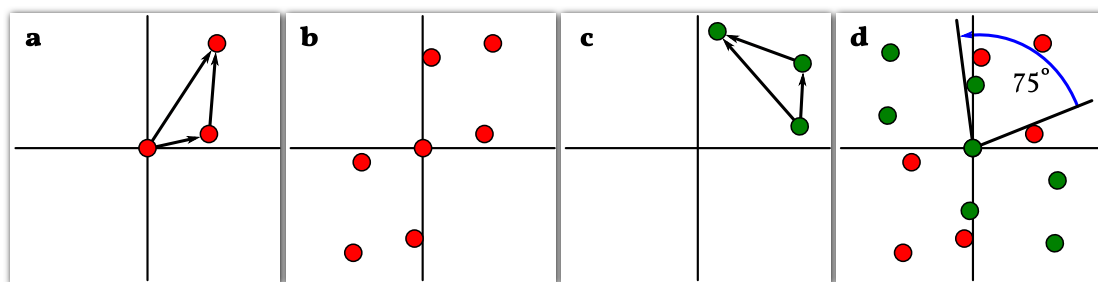


Abb. 1.7: Darstellung der Patterson-Rotationssuche. **a.** intramolekulare Vektoren einer zweidimensionalen Suchstruktur mit drei Atomen **b.** Patterson-Transformierung der Vektoren der Suchstruktur **c.** intermolekulare Vektoren der Zielstruktur mit unbekannter Anordnung im zweidimensionalen Raum **d.** Überlagerung der Patterson-Transformierten von Such und Zielstruktur. Der Rotationsversatz beträgt 75°. Darstellung nach Rupp, 2009.

stimmung mit der Pattersonkarte der Diffraktionsmessung gefunden wird (siehe Abb. 1.7).

Diese Vorgehensweise wird als Patterson-Kreuzkorrelationssuche bezeichnet. Die gleiche Methode kann verwendet werden, um die relative Lage mehrerer Kopien eines Moleküls in der asymmetrischen Einheit (nichtkristallographische Symmetrie, NCS) zu bestimmen, in diesem Fall spricht man von Patterson-Selbstrotationssuche. Nach der Bestimmung der relativen Orientierung der Zielstruktur muss ihre Lage in der Einheitszelle mithilfe der Patterson-Translationssuche bestimmt werden. Hierfür werden die intermolekularen Kreuzvektoren des Pattersonraumes verwendet. In der Praxis bietet sich an, Programme zu verwenden, die den molekularen Ersatz automatisiert durchführen, z.B. Balbes (Long *et al.*, 2008) oder Phaser (McCoy *et al.*, 2007a). Die Qualität der Lösungen von Rotations- und Translationssuche wird durch den Korrelationskoeffizient (CC) bestimmt, der die Übereinstimmung von Lösung und Messdaten angibt.

Da mit molekularem Ersatz bestimmte Phasen nicht auf experimentellen Daten beruhen, besteht bei dieser Technik immer das Problem, dass durch das Suchmodell ein systematischer Fehler („*model bias*“) erzeugt wird. Dies fällt insbesondere bei niedrigen Auflösungen des gemessenen Datensatzes ins Gewicht. Durch die Anwendung von Strukturoptimierung (z.B. *maximum-likelihood-refinement*) kann dieses Problem minimiert werden.

Eine Methode, die die Vorteile von experimenteller Phasierung und molekularem Ersatz kombiniert, ist MRSAD (molekularer Ersatz mit anomaler Diffraction, Schuermann *et al.*, 2003). Hierbei werden zunächst experimentelle Phasen berechnet und auf ihrer

Grundlage ein initiales Proteinmodell erstellt. Im nächsten Schritt wird ein molekularer Ersatz mit den Messdaten gerechnet und die Lösung optimiert. Die Phasen des molekularen Ersatzes und die der experimentellen Phasierung werden kombiniert und für die Generierung der Elektronendichtekarte verwendet. So können zwei Methoden, die unter Umständen einzeln nicht ausreichen um eine Struktur zu lösen, kombiniert werden und ihre jeweiligen Nachteile kompensieren.

1.5.2 Qualitätsfaktoren

FOM Die Qualität experimentell gewonnener Phasen wird durch den Ähnlichkeitsfaktor (figure of merit, FOM, m) ausgedrückt, siehe Gleichung 1.26. Dieser wird aus dem Cosinus des Phasenfehlers der gemittelten besten Strukturfaktoren berechnet, die wiederum aus dem gewichteten Durchschnitt der möglichen Phasenwahrscheinlichkeit bestimmt werden.

$$m = \cos(\Delta\phi) \quad (1.26)$$

Ist der Ähnlichkeitsfaktor klein, ist der Phasenfehler groß, und umgekehrt. In der Dichtemodifikation geht man bei FOM-Werten von 0.7 oder mehr von korrekten Phasenwerten aus.

CC Die Phasen einer Elektronendichtekarte, die durch molekularen Ersatz berechnet wurden, sind immer durch das verwendete Suchmodell beeinflusst (*model-bias*), daher wird zur Bewertung von MR-Lösungen der Korrelationskoeffizient (CC) verwendet, der in ähnlicher Form in statistischen Tests vorkommt. Er gibt die Übereinstimmung von Modell und gemessenen Daten an.

2 Materialien

2.1 Organismen

- *Paracoccus pantotrophus* GB17 (Bardischewsky *et al.*, 2001)

2.2 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese30	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calciumacetat	Fluka (München)
Cobalt(III)-Hexaminchlorid	Fluka (München)
Coomassie R250 Brilliant Blue	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
β -Mercaptoethanol	Fluka (München)
MilliQ-H ₂ O	Millipore (Billerica, MA, USA)
MPEG-5000	Fluka (München)
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe)

2 Materialien

TEMED	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid	Carl Roth (Karlsruhe)/FLUKA (München)
SDS	Carl Roth (Karlsruhe)

2.3 Puffer und Lösungen

2.3.1 SDS-PAGE

Probenpuffer (2x)	100 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.5 2 % SDS 5 % β -Mercaptoethanol 10 % Glycerin 0.01 % Bromphenolblau
Laufpuffer	250 mM TRIS pH 8.5 2 M Glycin 1 % SDS
Trenngel 15 %	Pro Gel (5 ml): 1.15 ml H ₂ O 2.5 ml Rotiphorese30 1.3 ml 1.5 M TRIS pH 8.8, 0.4 % SDS, 50 °l 10 % APS 2 μ l TEMED
Sammelgel 5 %	Pro Gel (1 ml): 690 μ l H ₂ O 170 μ l Rotiphorese30 130 μ l 1 M Tris/HCl pH 6.8, 0.4 % SDS, 10 °l 10 % APS 1 μ l TEMED
Größenstandard	LMW-Proteinmarker, GE Healthcare (Freiburg)
Coomassie-Färbung	Färbelösung in H ₂ O: 25 % Methanol 25 % Essigsäure

0.1 % Coomassie R250 Brilliant Blue

Entfärbelösung in H₂O:

30 % Ethanol

10 % Essigsäure

2.3.2 Kristallisationslösungen

Die initialen Screens wurden mit vorgefertigten Kits (Hampton- Research, Aliso Viejo, USA) durchgeführt. Für alle anderen Ansätze wurden jeweils Stammlösungen der einzelnen Komponenten mit einer Konzentration von 0.5 M oder 1 M angesetzt und sterilfiltriert (0.2 μ m). PEG-Stammlösungen wurden mit einer Konzentration von 50 % (w/v) angesetzt und nicht filtriert. Die Kristallisationsansätze wurden kurz vor der Kristallisation gemischt.

2.4 Geräte und Zubehör

Blockthermostat	Thermomixer Comfort, Eppendorf (Hamburg)
Protein-Gelelektrophorese	Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System, BioRad (München)
Mikroskope	SZX16, Olympus (Hamburg) CX31, Olympus (Hamburg) SteREO Discovery.V20, Zeiss (Jena)
pH-Messgerät	inoLab, WTW (Weilheim)
Pipetten	Pipetman 2-1000 μ l: Gilson Int. B.V. (Bad Camberg)
Elektrophorese-Netzgerät	PowerPac basic, Bio-Rad (München)
Vortexer	Vortex Genie 2, Scientific Industries (USA)
Magnetrührer	Variomag Mono, Komet Group (Besigheim)
Plattformschüttler	Tetramax, Heidolph (Schwabach)
Transilluminator	ColorControl, Desaga Sarstedt Group (Nümbrecht)
Kristallisationsinkubator	GrandCru, Liebherr (Ochsenhausen)

Zentrifuge	Centrifuge 5147R, Eppendorf (Hamburg)
Chromatographie-System (HPLC)	1100 Series, Agilent (Böblingen)
Chromatographie-Säule:	Superdex200 10/300 GL, GE Healthcare (Freiburg)
MALLS-Gerät	MiniDawn TREOS, Wyatt (Dernbach)
GNU/Linux-Computer:	Ubuntu 10.10 AMD Athlon(tm) 64 X2 Dual Core Processor 5000+ 4 GB RAM nVidia Corporation G92 (GeForce 9800 GT) 1024 MB
OSX-Computer	MacOSX Snow Leopard Intel Core2Quad 2.83 GHz 8 GB RAM nVidia GeForce 9800 GT 512 MB

2.5 Röntgenquellen

Röntgenquelle der Abteilung Strukturbioogie der CAU Kiel	
Röntgengenerator	I μ S Incoatec Mikrofocuss, Incoatec (Geesthacht)
Goniostat	mar345dtb desktop beamline, MarResearch (Norderstedt)
Detektor	mar345 Image Plate, MarResearch (Norderstedt)
Cryosystem	700 Series Cryostream Cooler, Oxford Cryosystems (UK)
MAD-Beamline X12, DESY, Hamburg	
Goniostat	mar345dtb desktop beamline, MarResearch (Norderstedt)
Detektor	MarMOSAIC 225 CCD (MarResearch, Norderstedt)
Cryosystem	700 Series Cryostream Cooler, Oxford Cryosystems (UK)
Beamline MX-14.2, BESSY, Berlin	
Goniostat	mar345dtb desktop beamline, MarResearch (Norderstedt)
Detektor	MX-225 CCD (Rayonics, Evanston, USA)
Cryosystem	Cryojet XTL Oxford-Instruments (UK)
Beamline ID23-1, ESRF, Frankreich	
Goniostat	ESRF Minidiffractometer
Detektor	ADSC Q315r CCD (ADSC Corp., Poway, USA)

Cryosystem	700 Series Cryostream Cooler, Oxford Cryosystems (UK)
Automatischer Probenwechsler	ESRF sample changer

2.6 Verbrauchsmaterialien Kristallisation

Kristallisationsplatten	Linbro 24-Well Plate, ICN (Eschwege)
Deckgläser	22 mm, Roth (Karlsruhe)
Siliconpaste	Baysilone Paste mittelviskos, Bayer (Leverkusen)
Nylonschleifen, montiert	0.05-0.1 mm bis 0.2-0.3 mm, Hampton Research (Aliso Viejo, USA)
Vials/Caps	Hampton Research (Aliso Viejo, USA)

2.7 Computerprogramme, Datenbanken

ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1997; Langer *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2008)
 Autorickshaw (Panjikar *et al.*, 2005; Panjikar *et al.*, 2009)
 BRENDA (Schomburg *et al.*, 2002; Scheer *et al.*, 2011)
 BLAST (Altschul *et al.*, 1990; Camacho *et al.*, 2009)
 CCP4 (CCP4, 1994)
 Clustalw (Higgins *et al.*, 1996; Chenna *et al.*, 2003)
 CNS (Brunger *et al.*, 1998)
 CAVER (Petrek *et al.*, 2006;)
 COMBAT (CCP4, 1994)
 COOT (Emsley *et al.*, 2004; Emsley *et al.*, 2010)
 DALI (Holm *et al.*, 2010)
 Delphi (Honig *et al.*, 1995)Rocchia2002
 DM (Cowtan *et al.*, 1996)
 DSSP (Kabsch *et al.*, 1983)
 ESPript (Gouet *et al.*, 2003)
 ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003)
 HIC-UP (Kleywegt, 2007)
 iMOSFLM (Battye *et al.*, 2011)
 Matthews_coeff (Kantardjieff *et al.*, 2003)

2 Materialien

MOLREP (Vagin *et al.*, 2000; Vagin *et al.*, 2010)
PDB (Berman *et al.*, 2000)
Phenix (Adams *et al.*, 2010)
PISA (Krissinel *et al.*, 2007)
Phaser (McCoy *et al.*, 2007b)
Pointless (CCP4, 1994)
PROCHECK (CCP4, 1994)
PyMOL, (Schrödinger, LLC, 2010)
REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997; Winn *et al.*, 2001)
Resolve (Terwilliger, 2000)
Scala (Evans, 2006)
SFCHECK (Vaguine *et al.*, 1999)
SHELXC, D und E; Version 1997-2008 (Sheldrick, 2010)
SMART (Letunic *et al.*, 2009)
SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009; Arnold *et al.*, 2009)
truncate (French *et al.*, 1978)
XDS, XSCALE, XDSCONV (Kabsch, 2010)

3 Methoden

3.1 Proteinherstellung

Die ausführliche Beschreibung des Protokolls der Herstellung von SoxCD₁ wurde 2000 veröffentlicht (Quentmeier *et al.*, 2000). Das SoxCD₁-Protein für die Kristallisation wurde von der AG Technische Mikrobiologie der TU Dortmund produziert und für diese Arbeit zu Verfügung gestellt. Hier sollen daher nur die allgemeinen Expressionparameter kurz zusammengefasst werden. Die Zelllinie *Paracoccus pantotrophus* GB17 wurde aerob in einem Fermenter (300 l) kultiviert. Um die Gene des Sox-Clusters zu aktivieren wurde als einzige Energiequelle Thiosulfat bereitgestellt. Die Zellen wurden nach Erreichen der stationären Wachstumsphase geerntet. SoxCD₁ wurde nativ gereinigt, d.h. es wurde keine Affinitätschromatographie verwendet. Nachdem mit einer Ammoniumsulfatpräzipitation unerwünschte Proteinanteile gefällt wurden, wurde der verbleibende Zellextrakt über eine Anionentauscher-Chromatographiesäule gereinigt, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie. Die Aktivität des gereinigten Proteins wurde durch einen *in vitro*-Assay verifiziert, bei dem die Thiosulfat-abhängige Reduktion von Pferdeherz-Cytochrom *c* durch SoxXA, SoxB, SoxCD und SoxYZ bestimmt wurde.

3.2 Proteinanalyse

3.2.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit dem Mini-Protean-System der Firma Biorad durchgeführt. Die Gele wurden mit der Roti-

3 Methoden

phorese 30 -Lösung (30 % Acrylamid-Bisacrylamid im Verhältnis 29:1) der Firma Carl Roth gegossen. Nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) wurden sie aus einem Sammelgel (15 % Acrylamid) und einem Trenngel (5 % Acrylamid) zusammengesetzt. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 4:1 mit 4x Ladepuffer gemischt, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und auf das Gel geladen. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteine im Gel mit Coomassie R250 Brilliant Blue angefärbt. Als Größenstandard wurde der *low molecular weight*-Proteinmarker der Firma GE Healthcare verwendet.

3.2.2 Analytische Hochdruckchromatographie

Zur exakten Bestimmung des Molekulargewichtes und des Oligomerisierungszustands wurde analytische Hochdruckchromatographie in Kombination mit Mehrwinkel-Lichtstreuung (multi angle laser light scattering, MALLS) verwendet. Die Proteinlösung (Konzentration: $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) wurde über ein Agilent-HPLC-Gerät auf eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule der Firma GE Healthcare geladen. Die Absorption bei 280 nm und 420 nm wurde detektiert, zusätzlich war ein MALLS-Gerät angeschlossen. MALLS ist eine Technik, mit der aufgrund der Lichtstreuungseigenschaften die Masse und Durchschnittsgröße von Partikeln bestimmt werden kann. Die MALLS-Technik kann für Lösungen oder Aerosole verwendet werden (Wyatt, 1968). Um eine absolute Massenbestimmung durchführen zu können, wurde zusätzlich das Signal eines RI-Detektors, der den Brechungsindex einer Lösung bestimmt, verwendet.

3.3 Proteinkristallisation

Zur Proteinkristallisation wurde die Dampfdiffusionsmethode mit hängendem Tropfen eingesetzt. Für die Kristallisationsansätze wurden 24-Well-Linbro-Platten, abgedichtet mit Silikon-Öl (Bayer), mit runden Deckgläschen (\varnothing 22 mm) zum Verschließen verwendet. Die Kristallisationstropfen wurden aus 1 μ l Reserviörlösung und 1 μ l Proteinlösung zusammengesetzt. Die ersten Screens wurden mit dem Crystal Screen I und II der Firma Hampton Research, die anschließende Optimierung mit den Additiv-Screens I-IV durchgeführt. Die erfolgreiche Kristallisationsbedingung wurde durch Reproduktion und Verbesserung der verschiedenen Parameter optimiert.

3.4 Kristallmontage

Um die Kristalle für Röntgenbeugungsexperimente bei 100 K zu verwenden, musste die Mutterlauge in den Lösungsmittelkanälen durch eine Cryolösung ersetzt werden, die 10 % Glycerin enthält. Diese Substanz wirkt als „Frostschutzmittel“ und verhindert, dass die im Kristall vorhandenen Wassermoleküle „eisartig“ gefrieren, was die röntgenkristallographische Messung massiv stören würde. Da die Kristalle gegenüber mechanischer Belastung sehr empfindlich sind, wurden sie sukzessive in Lösungen mit steigender Glycerinkonzentration überführt. Die Kristalle wurden jeweils eine Stunde in der jeweiligen Lösung inkubiert und dann sukzessive in die Lösung mit der nächsthöheren Konzentration transferiert (Schritte in 2 %-Stufen). Die Kristalle wurden anschließend in Nylon-Schleifen der Firma Hampton Research (\varnothing 0.1 mm) montiert und durch schnelles Eintauchen in flüssigen Stickstoff bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die so montierten Kristalle konnten unter flüssigem Stickstoff jahrelang gelagert werden.

3.5 Diffraktionsexperimente

Diffraktionsexperimente mit SoxCD wurden an verschiedenen Röntgenquellen durchgeführt, u.a. ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*, Grenoble, Frankreich), BESYII (Berliner Synchrotron, Berlin), DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron, Hamburg) und SLS (*Swiss Lightsource*, Villigen, Schweiz). Die Diffraktionsdaten, die zur Strukturlösung von SoxCD₁ verwendet wurden, wurden an der Beamline ID23-1, ESRF (Grenoble, Frankreich) gemessen. Die Wellenlänge dieser Beamline ist justierbar zwischen 5 keV und 20 keV und ist ausgerüstet mit einem ADSC Q315R-Detektor sowie einem ESRF/EMBL-Probenwechsler. Der geringe Durchmesser des Röntgenstrahls an dieser Beamline (30x40 μ m) ermöglicht es, auf bestimmte Bereiche im Kristall zu fokussieren, um so die bestmögliche Diffraktion zu erzielen. Alle Röntgenbeugungsexperimente wurden bei 100 K durchgeführt. Die wichtigsten Parameter der Datenmessungen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst..

3.5.1 Messung an der Eisen-Absorptionskante

Um die intrinsischen Metallzentren des SoxCD-Proteins für die Phasierung unter Nutzung des anomalen Streusignals zu nutzen, wurden Diffraktionsdaten an der Eisen-K-Absorptionskante (theoret. 1.7433 Å, 7.11 keV) gesammelt. Die optimale Wellenlänge wurde durch Messung der Röntgenfluoreszenz experimentell bestimmt. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zur Detektion des anomalen Signals zu verbessern, wurden die Daten mit hoher Redundanz gesammelt.

3.5.2 Messung eines hochauflösenden nativen Datensatzes

Von einem zweiten Kristall wurden Diffraktionsdaten bei einer Wellenlänge von 0.98 Å bis zu einem Bragg-Winkel von 1.3 Å Auflösung gemessen. Auf diesen Daten basiert das in der Proteindatenbank (PDB, Berman *et al.*, 2000) deponierte SoxCD₁-Modell.

Tab. 3.1: Parameter der Datenmessung

Datensatz	Fe-Kante	Hohe Auflösung
max. Auflösung [Å]	2.3	1.3
Wellenlänge [Å]	1.71	0.98
Detektorabstand [mm]	180	180
Rotation pro Bild [°]	1	0.5
Zahl der Bilder	360	120
Detektor	ADSC Quantum Q315r	ADSC Quantum Q315r

3.6 Datenintegration und -skalierung

Die Indizierung, Integration und Skalierung aller gemessenen Daten wurde mit dem Programm XDS (Kabsch, 2010) durchgeführt. Bei der Prozessierung des Eisenkanten-Datensatzes wurden die Reflexe der Bijvoet-Paare getrennt behandelt. Die Anzahl an

Molekülen in der asymmetrischen Einheit und der Lösungsmittelanteil des Kristalls wurde mithilfe des Programmes Matthews_coef (Kantardjieff *et al.*, 2003) aus der CCP4-Suite (CCP4, 1994) abgeschätzt.

3.7 Kombinierte SAD/MRSAD Phasierung

Die folgenden Schritte der Strukturlösung wurden mit dem SAD-Protokoll von Autorickshaw, der automatisierten Plattform zur Bestimmung von Kristallstrukturen des EMBL Hamburg (Panjikar *et al.*, 2009) durchgeführt. Die Diffraktionsdaten wurden mit Programmen der CCP4-Suite (CCP4, 1994) für die weitere Prozessierung verarbeitet. Die anomalen Strukturfaktor-Amplitudendifferenzen (FA) wurden mit dem Programm SHELXC (Sheldrick, 2010) berechnet. Zur Bestimmung der Substruktur wurde die Auflösung auf 2.9 Å beschränkt. Die Schweratompositionen wurden durch das Programm SHELXD (Schneider *et al.*, 2002) identifiziert. Die korrekte Händigkeit der Substruktur wurde mit den Programmen ABS (Hao, 2004) und SHELXE (Schneider *et al.*, 2002) bestimmt. Die initialen Phasen wurden nach Dichtemodifikation mit dem Programm SHELXE (Schneider *et al.*, 2002) berechnet. Die zweizählige Achse der nichtkristallographischen Symmetrie wurde mithilfe des Programms RESOLVE (Terwilliger, 2000) identifiziert. Dichtemodifizierung, Phasenerweiterung und die Mittelung der nichtkristallographischen Symmetrie (NCS) wurden mit dem Programm DM (Cowtan *et al.*, 1996) durchgeführt. 43.75 % des Modells wurden von dem Programm ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1997) anhand der vorgegebenen Proteinsequenz automatisch gebaut.

Das resultierende Modell des SAD-Protokolls wurde als Suchmodell für das Autorickshaw-MRSAD-Protokoll verwendet. Molekularer Ersatz wurde mit dem Programm Molrep (Vagin *et al.*, 2010) berechnet, gefolgt von Verfeinerungsrechnungen in CNS (Brunger *et al.*, 1998) und Refmac5 (Winn *et al.*, 2001). Basierend auf den aus dem molekularen Ersatz resultierenden Phasen wurde eine neue Schweratomsuche, gefolgt von Verfeinerung der Schweratompositionen, sowie Dichtemodifikation mit Programmen der CCP4-Suite (CCP4, 1994) durchgeführt. Nach einer erneuten Dichtemodifizierung und Mittelung der nichtkristallographischen Symmetrie mit dem Programm RESOLVE (Terwilliger, 2000) wurde mit SHELXE (Schneider *et al.*, 2002) ein Polyalanin-Modell gebaut. Die SoxCD₁-Aminosäuresequenz wurde mit RESOLVE (Terwilliger, 2000) in die Elektronendichte

gelegt und die resultierende Struktur mit Refmac5 (Winn *et al.*, 2001) verfeinert. Das finale Modell dieses Autorickshaw-Laufs wurde mithilfe von ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1997) um weitere Proteinbereiche und Lösungsmittelmoleküle ergänzt.

3.8 Erstellen eines hochaufgelösten Proteinmodells

Das resultierende 2.3 Å-Proteinmodell aus dem ARP/wARP-Lauf wurde zur Phasierung des hochaufgelösten Datensatzes verwendet. Die Abfolge der hierbei verwendeten Techniken und Programme ist in Abb. 3.1 dargestellt. Zunächst wurde eine Verbesserung der aus dem Autorickshaw-Modell generierten initialen Phasen durch Dichtemodifikation mit dem Programm DM (Cowtan *et al.*, 1996) erreicht. Aufgrund dieser verbesserten Phasen wurde mithilfe des Programms phenix_autobuild (Adams *et al.*, 2010) ein neues 2.3 Å-Modell berechnet und mit Refmac5 (Winn *et al.*, 2001) verfeinert. Mit dem CCP4-Programms truncate (French *et al.*, 1978) wurden die Strukturamplituden des hochauflösenden Datensatzes aus den gemessenen Intensitäten berechnet. Hierbei wurden 0.3 % der Beugungsreflexe zur Berechnung des freien R-Faktors (R_{free}) markiert. Die Strukturamplituden des 1.3 Å-Datensatzes wurden zusammen mit dem 2.3 Å-Modell in Refmac5 (Winn *et al.*, 2001) verwendet, um die Phasen des hochauflösenden Datensatzes zu generieren. Aufgrund der auf diesen Phasen beruhenden Elektronendichteverteilung wurde mit dem Programm ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1997) ein erstes Strukturmodell erstellt. Nach mehreren manuellen Korrekturschritten im Strukturvisualisierungsprogramm Coot (Emsley *et al.*, 2010), durchgeführt im Wechsel mit Verfeinerungsrechnungen mit Refmac5 (Winn *et al.*, 2001), wurde das 1.3 Å-Modell fertiggestellt. Die ersten Koordinaten der Cofaktoren wurden dem HIC-Up-Server (Kleywegt, 2007) entnommen, sie wurden mit Coot in die Elektronendichte eingepasst. Die Prinzipien von Dichtemodifikation, Modellbau und Verfeinerung sind in Abb. 4.9 dargestellt.

Zur Beurteilung der manuellen Anpassung und Verfeinerung des Strukturmodells wurden die R-Faktoren R_{work} und R_{free} verwendet. Sanken die Beträge dieser Werte während einer Verfeinerungsrechnung ab, war die Übereinstimmung des Modells mit den Messdaten verbessert. Der R_{free} -Wert beruht auf dem Prinzip der Kreuzvalidierung, in der ein zu Beginn der Prozessierung festgelegter Teil der Daten von der Verfeinerung ausgenommen wird. Die Richtigkeit des Modells nach der Verfeinerung wird anschließend

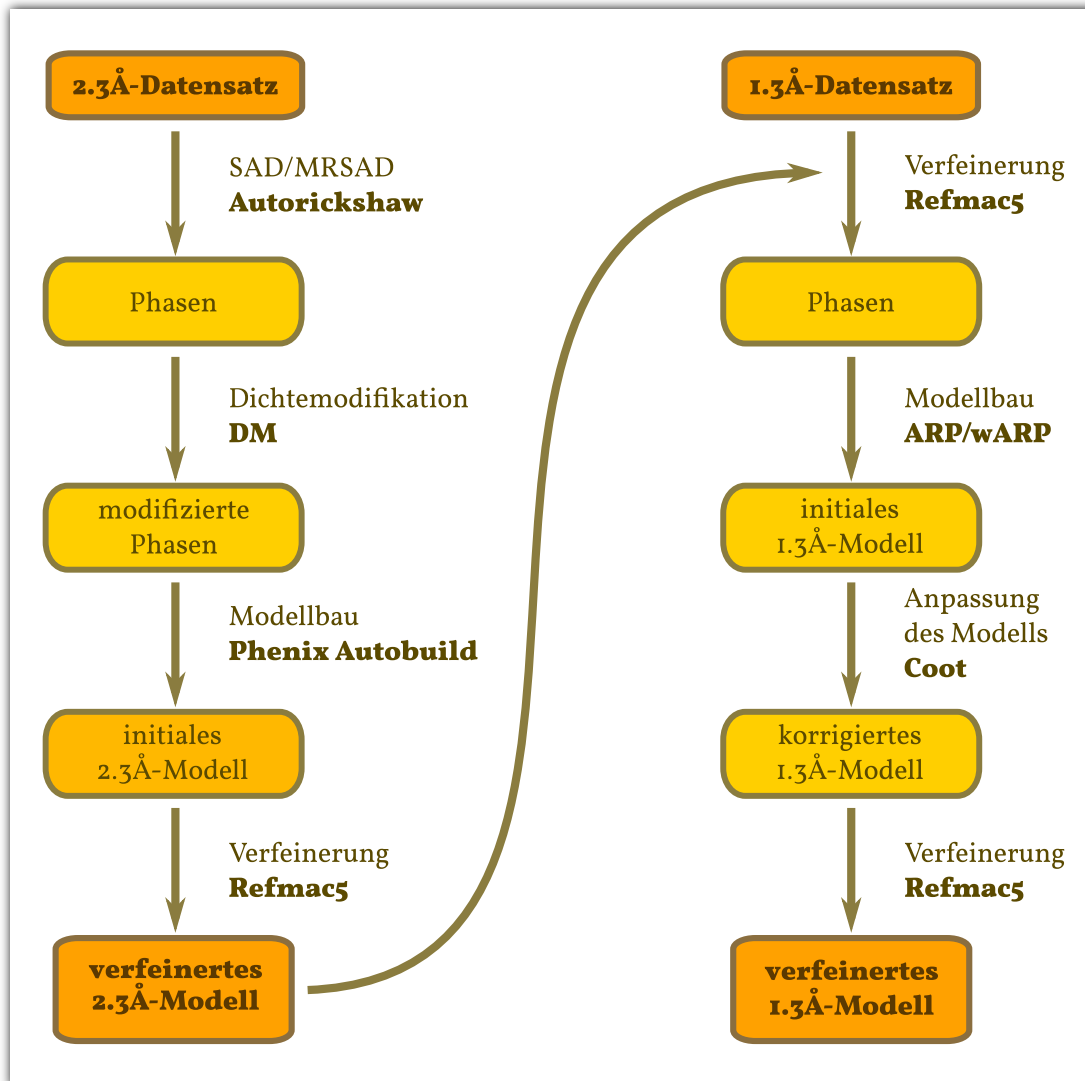


Abb. 3.1: Erstellung des 1.3-Å-SoxCD₁-Modells.

3 Methoden

durch den Vergleich mit den nicht zur Verfeinerung herangezogenen Messwerten überprüft. Die stereochemische Plausibilität des Proteinmodells und die Übereinstimmung mit den gemessenen Daten wurde mit den CCP4-Programmen Procheck (CCP4, 1994) und SFCHECK (Vaguine *et al.*, 1999) analysiert. Zur Annotation der Sekundärstrukturen in der endgültigen PDB-Datei wurde das Programm DSSP (Kabsch *et al.*, 1983) verwendet. Nach der Fertigstellung wurde das SoxCD₁-Proteinmodell in der Proteindatenbank (PDB, Berman *et al.*, 2000) abgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Nomenklatur: SoxCD₁

Von der Wildtyp-Sulfandehydrogenase aus *Paracoccus pantotrophus* wurde gezeigt, dass sie als Heterotetramer vorliegt, daher wurde der Proteinkomplex als Sox(CD)₂ bezeichnet (Bardischewsky *et al.*, 2005). Das Wildtyp-SoxD-Protein besteht aus zwei cytochromartigen Faltungsdomänen. Während der Reinigung des Proteinkomplexes wurde beobachtet, dass die C-terminale Cytochromdomäne, vermutlich durch proteolytische Spaltung, abgetrennt wurde. Dieser Effekt hatte allerdings keinen Einfluss auf die Funktion des Proteinkomplexes *in vitro*. Auf genetischer Ebene wurde daher die c-terminale Cytochrom-Domäne entfernt (siehe Abb. 4.1). Das resultierende Protein zeigte die gleiche *in-vitro*-Aktivität wie Sox(CD)₂. Da man davon ausging, dass die entfernte Cytochrom-Domäne die Tetramerisierung des Wildtyp-Proteins bewirkte, wurde das veränderte Protein als SoxCD₁ bezeichnet. Dieses Konstrukt wurde aufgrund seiner erhöhten Rigidität im Vergleich zum Wildtyp für die Kristallisation verwendet.

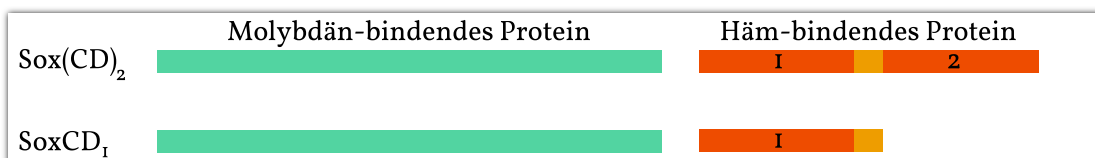


Abb. 4.1: Schema: Wildtyp-Protein Sox(CD)₂, verkürzte Version SoxCD₁

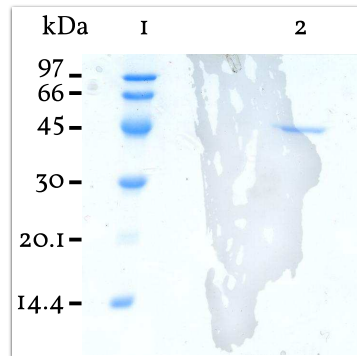


Abb. 4.2: SDS-PAGE. Spur 1: LMW-Größenstandard. Spur 2: SoxCD₁. Die Bande bei ca. 45 kDa entspricht SoxC, SoxD ist durch Färbemethoden in SDS-Gelen nicht detektierbar.

4.2 Proteinanalyse

4.2.1 SDS-Gelelektrophorese

Zur Untersuchung der Reinheit des Proteins wurde eine denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. 5 μ l Proteinlösung wurde mit 5 μ l Probenpuffer versetzt und durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert. Zur Auftrennung der Probe wurde ein 15 %-SDS-Polyacrylamidgel verwendet, als Größenstandard wurde der Low Molecular Weight SDS-PAGE Marker (GE Healthcare) verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteinbanden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Abb. 4.2 zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE. Spur 1 zeigt die Markerproteine, deren jeweilige Molekulargewichte in kDa angegeben sind. In Spur 2 ist eine Proteinbande bei ca. 45 kDa zu erkennen, was dem Molekulargewicht von SoxC entspricht (berechnet: 43444.2 Da). SoxD₁ (21884.1 Da) ist auf dem Gel nicht zu erkennen, da es weder durch Coomassie- noch durch Silberfärbung in SDS-Gelen zu detektieren ist. Die einzige Möglichkeit der Visualisierung von SoxD₁ nach einer SDS-PAGE ist die Durchführung eines Western-Blots mit spezifischen Antikörpern gegen SoxD₁ (Bardischewsky *et al.*, 2005).

4.2.2 Analytische Gelfiltration (HPLC/MALLS)

Zur Verifizierung des Molekulargewichtes und der Quartärstruktur von SoxCD₁ in Lösung wurde eine analytische Hochdruckchromatographie mit einer hochauflösenden Gel-

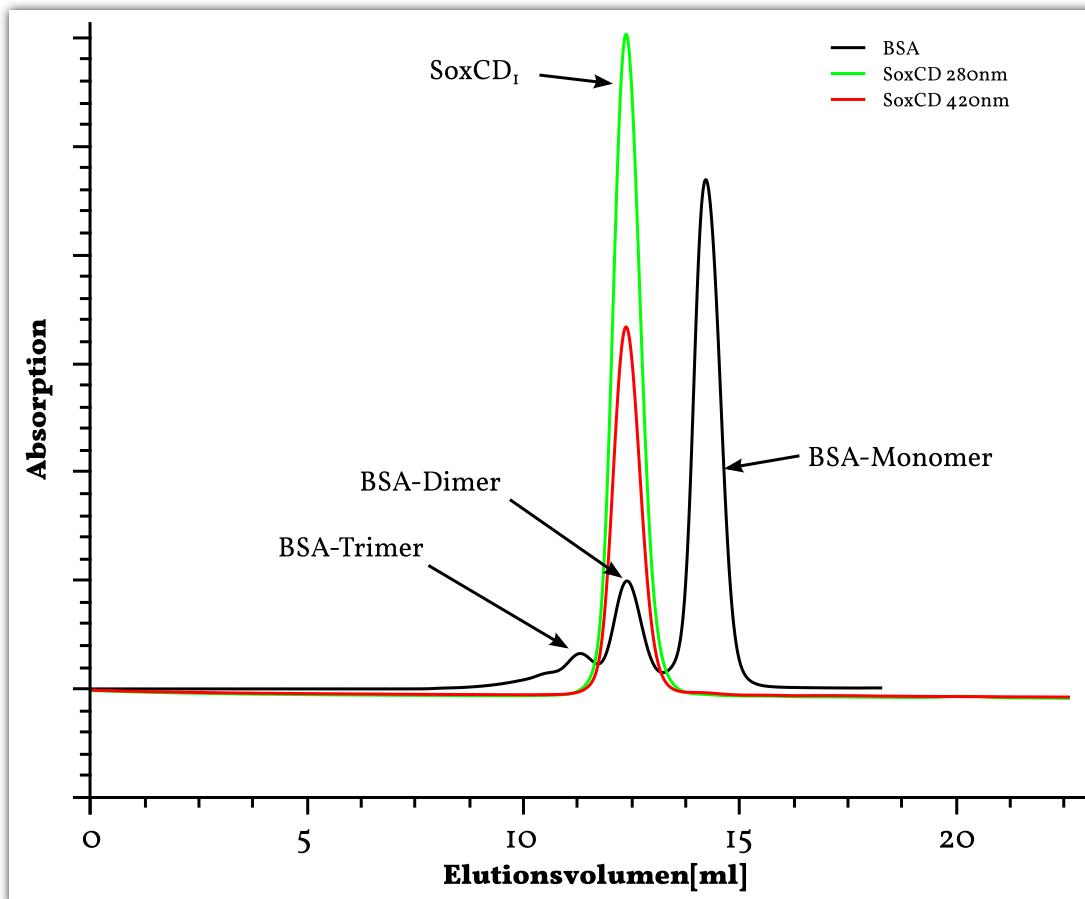


Abb. 4.3: SoxCD₁: Analytische Gelfiltration, Absorptionskurven. Dargestellt sind die überlagerten Absorptionskurven der Kalibrierung mit BSA (M_r (Monomer) = 66 kDa, UV280) und von SoxCD₁ (M_r = 130.4 kDa, UV280., Abs420)

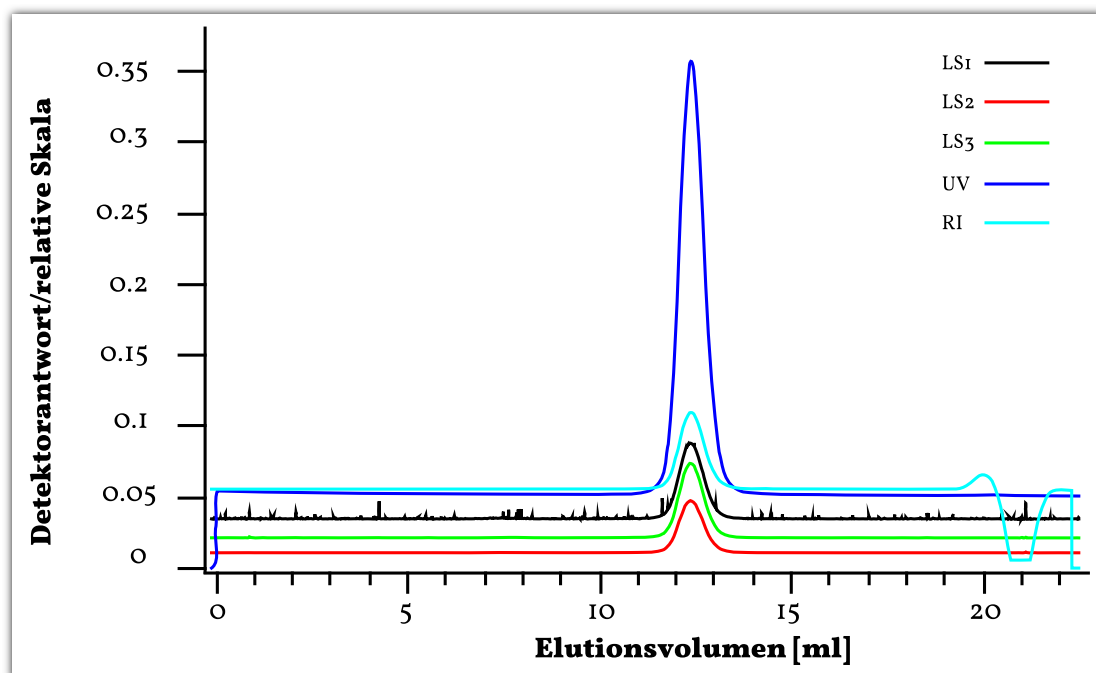


Abb. 4.4: SoxCD₁: Analytische Gelfiltration, MALLS-Analyse. Dargestellt sind die Detektorantworten dreier Lasersignale (LS1, LS2, LS3), des Brechungsindex-Detektors (RI) und des UV-Detektors.

filtrationssäule (Superdex 200) durchgeführt. Zur Kalibrierung der Säule wurde bovines Serum-Albumin (BSA) verwendet mit einem Molekulargewicht von 66 kDa (monomere Form). Zur Detektion des Proteinpeaks wurde die UV-Absorption des Säulendurchflusses bei 280 nm verfolgt. Da SoxCD₁ aufgrund des Häm-Cofaktors von SoxD₁ wie auch andere Cytochrome im blauen Bereich absorbiert, wurde zusätzlich die Absorption bei 420 nm gemessen. Abb. 4.3 zeigt die überlagerten Absorptionskurven der Chromatogramme von BSA (schwarz), wobei zwischen Monomer, Dimer und Trimer unterschieden werden kann, und SoxCD₁ (grün, rot). SoxCD₁ erscheint im Chromatogramm als einzelner symmetrischer Peak, was die hohe Stabilität des Proteins und die homogene Qualität der Proteincharge belegt. Das Elutionsvolumen des Peaks entspricht ziemlich genau dem des BSA-Dimers von ca. 131 kDa. Neben der Kristallstruktur ist dies ein sehr deutlicher Hinweis darauf, dass SoxCD₁ in Lösung als Heterotetramer von 130.4 kDa vorliegt und nicht, wie zuvor veröffentlicht, als Heterodimer von 65.2 kDa (Bardischewsky *et al.*, 2005).

Zur absoluten Massenbestimmung war ein MALLS-Detektor kombiniert mit einem RI-Detektor an die HPLC-Anlage angeschlossen. Die Messkurven von drei Detektoren mit unterschiedlichen Streuwinkeln, die UV280-Absorption sowie die Messkurve des refrakto-

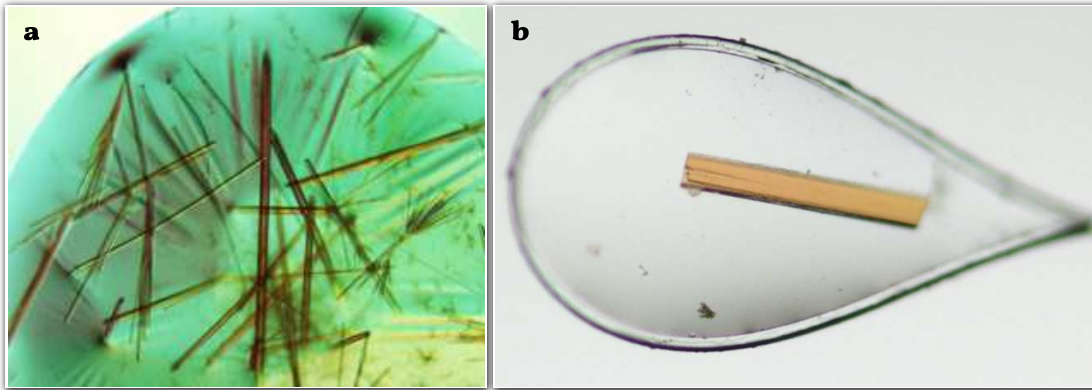


Abb. 4.5: SoxCD₁-Kristalle. **a.** Im Kristallisationstropfen **b.** Montiert in einem 0.1 mm Cryoloop.

rischen Index sind in Abb. 4.4 dargestellt. SoxCD₁ erscheint hier, wie auch im Absorptionsschmatogramm (siehe Abb. 4.3) als einzelner, hochsymmetrischer Peak, was darauf hindeutet, dass in der Lösung nur ein Oligomerisierungszustand vorhanden ist. Die Masse, die dem MALLS-Signal zuzuordnen ist, beträgt 123.4 kDa, was in den Grenzen der Messgenauigkeit der SoxCD₁-Heterotetramermasse von 130.4 kDa entspricht.

4.3 Proteinkristallisation

Das initiale Screening nach Kristallisationsbedingungen wurde mit den Crystal Screens I und II, die Optimierung der initialen Bedingung mit dem Additiv-Screen I-IV der Firma Hampton Research durchgeführt. Kristalle von SoxCD₁ bildeten sich bei Verwendung einer Fällungsmittellösung, die 4 % (w/v) MPEG 5000, 40 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM Calciumacetat, und 10 mM Co(III)-hexaminchlorid enthielt. Bei dieser Bedingung bildeten sich dunkelrote, nadelförmige Kristalle mit ca. 50 μm Durchmesser und ca. 800 μm Länge (siehe Abb. 4.5).

4.4 Diffraktionsmessungen

Für die Strukturlösung von SoxCD₁ wurden zwei Datensätze verwendet: ein SAD-Datensatz, gemessen an der Eise-K-Kante, wurde für die Bestimmung der Phasen benutzt und

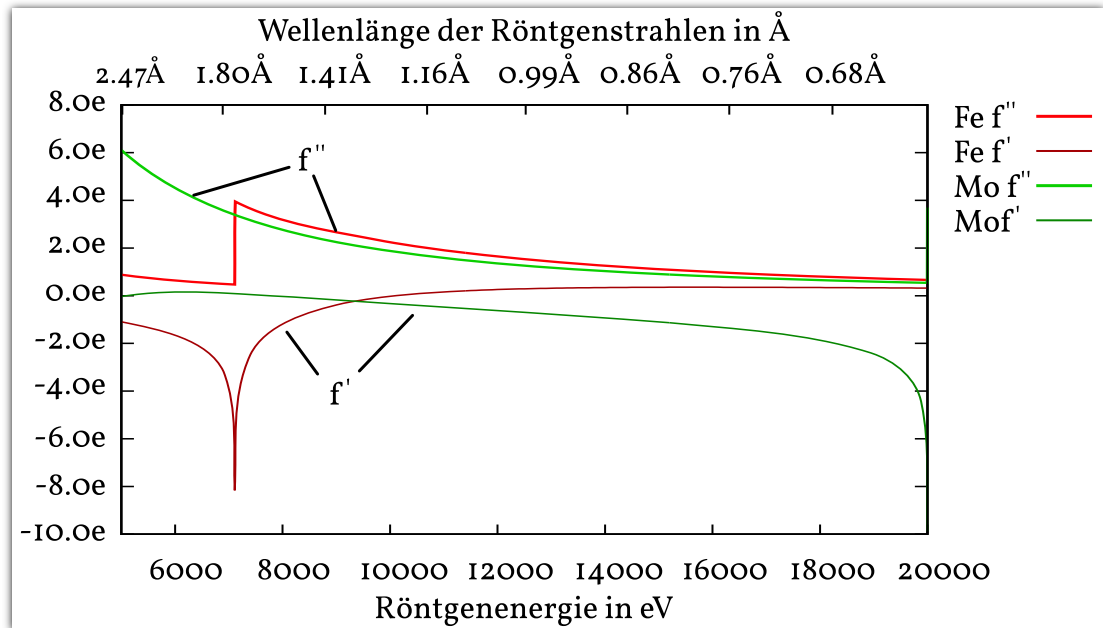


Abb. 4.6: Theoretisches Absorptionsspektrum im Bereich der Fe-K-Kante. rot: Eisen-Spektrum, grün: Molybdän-Spektrum. Die dickeren Linien zeigen das anomale Signal f'' , die dünneren Linien das dispersive Signal f' . Die Y-Achse gibt an, wieviele Elektronen zu f'' und f' beitragen.

ein hochaufgelöster Datensatz für die Erstellung des endgültigen Proteinmodells. In Tabelle 4.1 sind die Statistiken der für die SoxCD₁-Strukturlösung verwendeten Datensätze zusammengestellt.

Abb. 4.6 zeigt das berechnete Absorptionsspektrum von Eisen und Molybdän im Bereich der Eisen-K-Absorptionskante. Die Wellenlänge, bei der der Unterschied zwischen anomalem und dispersivem Signal maximal ist (Peak-Wellenlänge), wurde durch Röntgenabsorptionsspektroskopie bestimmt.

Tab. 4.1: Statistiken für Sammlung, Prozessierung und Verfeinerung der Diffraktionsdaten, in Klammern sind die jeweiligen Werte für die höchste Auflösungsschale angegeben.

Datensammlung und -prozessierung		
Daten	SAD-Peak	Hohe Auflösung
Röntgenquelle	ID23-1 (ESRF, Grenoble, France)	
Detektor	ADSC Quantum Q315r	
Wellenlänge (Å)	1.74	0.98
Temperatur (K)	100 K	100 K
Kristall-Detektor-Abstand (mm)	180	180
Rotation pro Bild (°)	1.0	0.5
Gesamtrotation (°)	360	60
Raumgruppe	P3(1)	P3(1)
Zelldimensionen (Å)	a=123.19, c=76.42	a=122.97, c=76.39
Auflösungsgrenze (Å) ¹	50 - 2.37 (3.0 - 2.37)	50 - 1.33 (1.4 - 1.33)
Vollständigkeit (%) ¹	92.4 (88.2)	92 (72.9)
Zahl der Reflexe (gesamt/davon einzigartig)	550606 / 48615	507433 / 273185
Durchschnittliche Redundanz	11.3 (11.2)	1.8 (1.5)
$I/\sigma(I)$ ¹	31.4 (19.5)	11.8 (2.6)
$R_{p.i.m.}$ ²	2.0 (5.9)	4.1 (25.2)
B -Faktor, nach Wilson-Plot (Å ²)	27.0	9.7
Verfeinerung		
Auflösungsgrenze (Å) ¹		50 - 1.33
Zahl der einzigartig ¹		273185
Vollständigkeit (%)		96.8
R_{crist} (%) ³		9.8
R_{free} (%) ⁴		11.2
Zahl aller Nichtwasserstoffatome		10432
Proteinatome		9473
Solvensatome		959
Ramachandran-Plot (%) ⁵		97.1 / 2.8 / 0.1
Koordinatenfehler ⁶		0.169
<i>Abweichungen von Idealwerten (Rmsd)</i>		
Bindungslängen (Å)		0.028
Bindungswinkel (°)		2.368
Mittlerer B -Faktor (Å ²) per Proteinkette A / B / C / D		10.7 / 13.2 / 10.9 / 12.8
Rückgrat		9.5 / 12.0 / 9.4 / 11.8
Seitenketten		11.8 / 14.5 / 11.6 / 13.9
Solvens		19.6
PDB-Eintrag		2XTS

¹ Werte in Klammern: hohe Auflösung² $R_{p.i.m.} = 100 \times \sum_{hkl} \left[\frac{1}{N-1} \right] \frac{1}{2} \sum_i \frac{|I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ wobei $I_i(hkl)$ die Intensität der i ten Messung der Reflexe mit den Miller'schen Indizes hkl und $\langle I(hkl) \rangle$ die mittlere Intensität aller Messungen von $I(hkl)$ ist, kalkuliert für $I \geq 3\sigma(I)$. N gibt die Redundanz der gemessenen Reflektionen an (Weiss, 2001, Diederichs et al., 1997)³ $R_{crist} = 100 \times \frac{\sum (|F_{obs}| - k|F_{calc}|)}{\sum |F_{obs}|}$, mit F_{obs} und F_{calc} als gemessene bzw. kalkulierte Strukturfaktor-Amplituden.⁴ R_{free} ist entsprechend dem R_{crist} berechnet, verwendet aber die 0.025% der Reflexe, die vom Verfeinerungsprozess ausgenommen sind (Brunger, 1992, Tickle et al., 2000).⁵ Berechnet mit Procheck (CCP4, 1994): bevorzugt/erlaubt/verboten⁶ Berechnet mit Scheck (Vaguine et al., 1999), basierend auf einem Luzzati-plot.

Tab. 4.2: Berechnete Kristallpackungsdichte für SoxCD₁

Nmol/asym	Matthew Coef	% Solvens	Wahrscheinlichkeit
1	5.10	75.89	0.01
2	2.55	51.79	0.98
3	1.70	27.68	0.01
4	1.27	3.57	0.00

4.5 Auswertung der Datensätze

4.5.1 Bestimmung von Raumgruppe und Kristallpackung

Die Auswertung der Röntgendaten mit XDS (Kabsch, 2010) ergab, dass das Kristallgitter der SoxCD₁-Kristalle ein trigonales Kristallsystem mit den Zellparametern $a=123.2$ Å und $c=76.4$ Å bildet. Mit dem CCP4-Programm Pointless (CCP4, 1994) wurde die Raumgruppe P3₁ als die wahrscheinlichste bestimmt.

Aus den Raumgruppeninformationen konnte anhand der Aminosäuresequenz des kristallisierten Proteins die Packungsdichte der Kristalle mit dem Programm Matthews_coef (Kantardjieff *et al.*, 2003) bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Da Proteinkristalle einen Lösungsmittelanteil zwischen 40 % und 60 % aufweisen (Matthews, 1968), wurde aufgrund der in Tabelle 4.2 gezeigten Werte die Anzahl von zwei SoxCD₁-Molekülen in der asymmetrischen Einheit erwartet.

4.5.2 Verzwillingung

Mit dem Programm truncate (French *et al.*, 1978) wurden die Diffraktionsdaten auf Verzwillingung überprüft. Hierzu werden zwei statistische Tests durchgeführt: der Yates-H-Test, und der Yates-Padilla-L-Test, der etwas sensibler ist und unabhängig von Twinning-

Gesetzen läuft. Der L-Test ergab einen Wert von 0.48, was darauf hinweist, dass die Daten Verzwillingung aufwiesen (keine Verzwillingung: 0.5, perfekte Verzwillingung: 0.375). Der H-Test, der auf die Daten auf fraktionale Verzwillingung entsprechend der Twinoperatoren der Raumgruppe testet, war negativ, d.h. es wurde keine Verzwillingung festgestellt. (Mean acentric moments of E: Twinning Fraction 0.033)

Insgesamt ist die Verzwillingung niedrig im Vergleich mit SoxCD₁-Datensätzen, die von Röntgenquellen mit größerem Strahldurchmesser stammen: Der L-Test des Datensatzes scd_172, der an Beamline X12 (DESY) gemessen wurde, ergibt einen Wert von 0.442. Zusätzlich detektierte der H-Test drei Fraktionen von Verzwillingung: -h,-k,l: 0.08, -h-k,k,-l: 0.11, h+k,-k,-l: 0.09 (Mean acentric moments of E: Twinning Fraction 0.101)

4.6 Strukturlösung

4.6.1 Automatisierter Teil: Autorickshaw SAD/MRSAD-Phasierung

Die Bestimmung der SoxCD₁-Phasen wurde mit der automatischen Strukturlösungspipeline Autorickshaw durchgeführt (Panjikar *et al.*, 2005). Vorgegeben wurden hierzu die integrierten Diffraktionsdaten mit getrennt behandelten Friedelpaaren, die Sequenz des Proteins, die Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit sowie die Anzahl der anomal streuenden Atome pro Proteinmolekül.

Mit SHELXD (Sheldrick, 2010) wurden die Koordinaten einer Substruktur bestimmt. Zwei Positionen mit der Besetzungsdichte 1 konnten den Eisenatomen zugeordnet werden, zwei weitere mit einer Besetzungsdichte von ca. 0.7 den Molybdänatomen. Wie in Abb. 4.6 gezeigt, ist bei einer Wellenlänge von ca. 1.7 Å das anomale Signal von Molybdän vorhanden, die Differenz zwischen anomalem und dispersivem Beitrag ist allerdings niedriger als bei Eisen. Zwei weitere Positionen in der Substruktur haben eine Besetzungsdichte von unter 0.15 und konnten einem Phosphor- und einem Calciumatom zugeordnet werden. Mit SHELXE wurde die originale Händigkeit der Phasen als korrekt bestimmt.

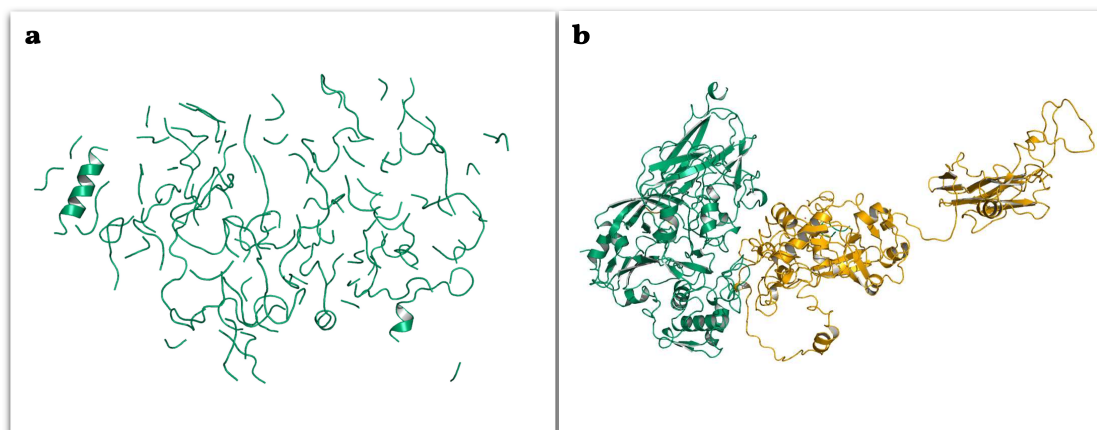


Abb. 4.7: Von Autorickshaw erstellte SoxCD-Modelle. a. Proteinmodell nach SAD-Lauf, 528 Reste.
b. Proteinmodell nach MRSAD-Lauf, 1154 Reste.

Mit DM (Cowtan *et al.*, 1996) wurde eine Dichtemodifikation und Phasenerweiterung berechnet, der resultierende Ähnlichkeitsfaktor (DM FOM) war 0.737. Abb. 4.7 b zeigt das aus Autorickshaw resultierende SoxCD₁-Modell.

Mit RESOLVE (Terwilliger, 2000) wurde eine erneute Dichtemodifikation, Phasenerweiterung und die Mittelung der nichtkristallographischen Symmetrie (NCS) berechnet. Die NCS konnte mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.82 bestimmt werden. Die berechneten Phasen wurden für den ersten Modellbauschritt mit ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1997) verwendet. In 74 Zyklen wurde automatisch ein Modell mit 528 Resten generiert, von denen die meisten als Alanine in die Elektronendichte eingepasst wurden (siehe Abb. 4.7 a). Die berechnete Genauigkeit betrug 70.2 % bei einer Sequenzabdeckung von 1 %. Der R-Faktor (R_{work}) für das Modell betrug ca. 24 %.

Dieses unvollständige Modell wurde im Rahmen des MRSAD-Protokolls von Autorickshaw automatisch für die MR-Suche mit dem Programm MOLREP (Vagin *et al.*, 2010) verwendet. Die resultierenden Phasen wurden mit CNS (Brunger *et al.*, 1998) berechnet und mit Refmac5 (Winn *et al.*, 2001) verfeinert (R_{work} : 47 %, R_{free} : 51 %). Mit Phaser (McCoy *et al.*, 2007b) wurden 35 Positionen von anomalen Streuern bestimmt. Da die Phasen des Datensatzes zu diesem Zeitpunkt deutlich besser waren als am Beginn der Strukturlösung, wurde das anomale Signal von zusätzlichen Atomen detektiert. Abb. 4.8 zeigt die Elektronendichtekarte der anomalen Peaks und die zugeordneten Atome. Die Positionen der Schweratome wurden mit MLPHARE (CCP4, 1994) verfeinert, anschließend erfolgte eine Dichtemodifikation mit Pirate (CCP4, 1994) und RESOLVE (Terwilliger,

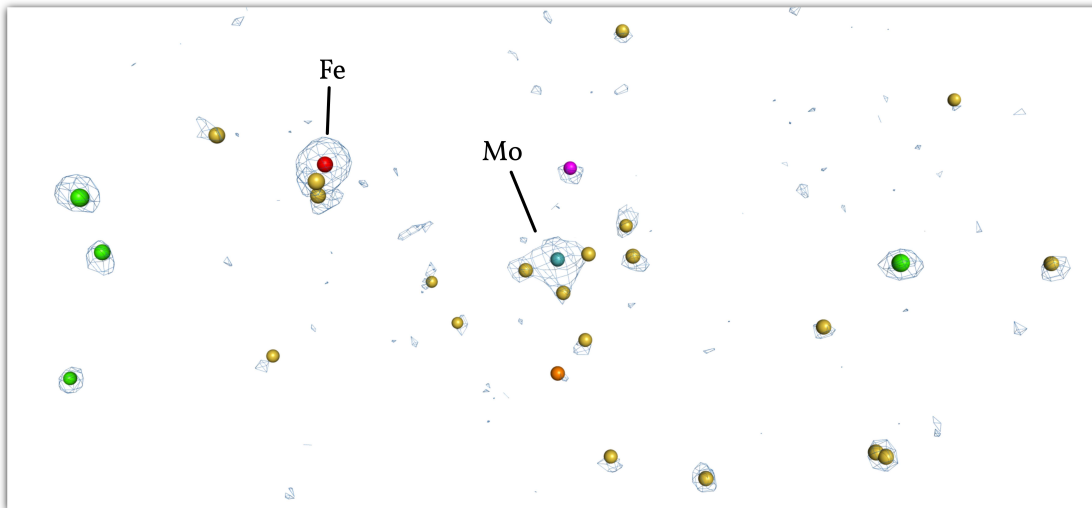


Abb. 4.8: Anomale F_oF_c , α_c -Elektronendichtekarte eines SoxCD₁-Protomers. Die Elektronendichte ist als blaues Gitter dargestellt, die Konturierung beträgt 3.0σ . Die den anomalen Maxima zugeordneten Atome sind als Sphären dargestellt. rot: Eisen, türkis: Molybdän, gelb: Schwefel, magenta: Kobalt, orange: Phosphor, grün: Calcium

2000). In die modifizierte Dichte wurde durch SHELXE ein Poly-Alaninmodell mit 878 Resten gebaut, auf dessen Grundlage 528 Reste der SoxCD₁-Sequenz mit RESOLVE gedockt wurde. Die anschließende Verfeinerung mit Refmac5 ergab einen R-Faktor von 39 % und einen freien R-Faktor von 45 %.

Im letzten Schritt der automatischen Strukturlösung wurde mit ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1997) ein Modell mit 1154 Resten, also ca. 97 % des gesamten Proteins, gebaut. Die anschließende Strukturoptimierung mit dem Programm Refmac5 ergab einen R-Faktor R_{work} von 18 % und einen freien R-Faktor R_{free} von 24 %.

In Abb. 4.9 sind die Prinzipien von Dichtemodifizierung, Modellbau und Verfeinerungsrechnung am Beispiel der SoxCD₁-Struktur gezeigt.

4.6.2 Strukturlösung, nichtautomatisierter Teil

Verbesserung des 2.3 Å-Modells

Das in Abb. 4.7 b gezeigte Proteinmodell war trotz hoher Sequenzabdeckung noch fehlerhaft. Aufgrund der technischen Voraussetzungen des Modelling-Vorgangs wurden die eigentlich getrennt vorliegenden Proteinketten der SoxC- und SoxD-Untereinheiten als eine einzige Polypeptidkette interpretiert und entsprechend gelegt. Die Elektronendichte, die von den Cofaktoren stammte, war als Proteinkette interpretiert worden, und die verbleibende Elektronendichte wurde mit Wassermolekülen interpretiert. Daher wurden nur die Phasenwerte aus dem letzten Verfeinerungsschritt des Autorickshaw-MRSAD-Modells weiterverwendet. Zunächst wurde mit DM eine wiederholte Dichtemodifikation durchgeführt. Die deutlich verbesserte Elektronendichte wurde als Eingabe im Modellbauprogramm Phenix Autobuild (Adams *et al.*, 2010) zusammen mit der SoxCD₁-Sequenz verwendet. Das resultierende Modell hatte einen R-Faktor von 21 %, einen freien R-Faktor von 25 %, und einen Korrelationskoeffizienten (CC) von 80 %. Die in das Modell automatisch eingebauten Wassermoleküle wurden manuell gelöscht und anschließend wurde mit Refmac5 eine Verfeinerungsrechnung durchgeführt ($R_{work}=20$ %, $R_{free}=26$ %, FOM=0.93). Mit Coot (Emsley *et al.*, 2010) wurde der Verlauf der Proteinketten manuell korrigiert und anschließend eine erneute Verfeinerungsrechnung mit Refmac5 durchgeführt. Der resultierende R-Faktor des 2.3 Å-Proteinmodells betrug 22 %, der freie R-Faktor 28 % und der FOM-Wert 92 %. Diese R-Faktoren sind im Vergleich mit dem Autorickshaw-MRSAD-Modell erhöht. Dies liegt daran, dass in dem Modell nur die Elektronendichte interpretiert ist, die von der Proteinkette stammt. Cofaktoren, Wassermoleküle oder andere Bestandteile der Kristallpackung wurden zu diesem Zeitpunkt nicht modelliert.

Erstellung des 1.3 Å-Modells

Das nur aus den Proteinketten bestehende 2.3 Å-Modell wurde für die Phasierung eines 1.3 Å-Datensatzes verwendet, der zur Erstellung des endgültigen 1.3 Å-SoxCD₁-Modells verwendet wurde. Im ersten Schritt wurde mit Refmac5 eine Verfeinerungsrechnung für die 1.3 Å-Diffraktionsdaten auf der Grundlage des zuvor erstellten 2.3 Å-Proteinmodell

durchgeführt. Hierdurch wurden die initialen Phasen für den 1.3 Å-Datensatz generiert, die gemeinsam mit der SoxCD₁-Sequenz für den automatischen Modellbau in ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1997) verwendet wurden.

In mehreren Schritten wurden die Proteinketten mit COOT (Emsley *et al.*, 2010) manuell überprüft und gegebenenfalls in die Elektronendichte eingepasst, außerdem wurden die Cofaktoren, Ionen, Glycerin und Wassermoleküle hinzugefügt. Aufgrund der Koordinationssphäre in der Elektronendichte und des anomalen Streubeitrags konnten zwei Atome als Cobalt bestimmt werden, weitere Atome, die sich in der Umgebung des Proteinmodells bzw. an der Interaktionsfläche zwischen verschiedenen Proteinmolekülen in der Kristallpackung befinden, wurden als Calciumionen identifiziert. Abwechselnd mit der manuellen Anpassung in COOT wurden Strukturoptimierungsrechnungen mit Refmac5 (Winn *et al.*, 2001) durchgeführt, um die Korrektheit manueller Änderungen zu verfolgen. Hierbei konnten aufgrund der steigenden Qualität der Phasen die Verfeinerungsparameter angepasst werden. Die Verfeinerungsrechnungen am Ende des Strukturlösungsprozesses wurden unter anisotroper Verfeinerung der Atomkoordinaten (*mixed mode*), ohne Berücksichtigung von Vorgaben durch die nichtkristallographische Symmetrieachse, durchgeführt. Der R-Faktor des endgültigen Proteinmodells beträgt 9.8 %, der freie R-Faktor 11.2 %.

4.7 Qualität des Modells

Das aus der Verfeinerungsrechnung resultierende 1.3 Å-SoxCD₁-Modell zeigt, dass SoxCD₁ als Heterotetramer vorliegt, also aus zwei SoxCD-Protomeren ($\alpha 2 \beta 2$) aufgebaut ist, wobei die Dimerisierung über die SoxC-Proteine stattfindet. Die Proteinketten konnten nahezu vollständig in der Elektronendichte modelliert werden, nur die N-terminalen Reste sind nicht definiert. Da beide Proteine mit einem Signalpeptid exprimiert werden, das während des Transfers in den periplasmatischen Raum proteolytisch abgeschnitten wird, beginnt die SoxC-Kette des Modells mit Rest 42, und die SoxD-Kette mit Rest 26.

Der durchschnittliche Temperaturfaktor (*B*-Faktor) gibt die Beweglichkeit der einzelnen Atome im Proteinmodell wieder. Der Wilson *B*-Faktor dagegen beruht nur auf den Diffraktionsdaten und gibt die Unschärfe der Elektronendichte innerhalb der Elementarzelle

4 Ergebnisse

an. Er basiert auf der Annahme, dass die gemessenen Intensitäten durch Ungenauigkeiten der einzelnen Atome und der Gitterebenen im Kristall abgeschwächt werden. Im Wilson-Plot wird der natürliche Logarithmus der gemessenen Intensität geteilt durch die absolute Intensität $\ln \frac{I_{obs}}{I_{abs}}$ gegen das inverse Quadrat der Auflösung $(\sin \frac{\Theta}{\lambda})^2$ aufgetragen. Der Plot verläuft in den höheren Auflösungsbereichen entlang einer Regressionsgerade, aus deren Steigung, wie in Gleichung 4.1 beschrieben, der B -Faktor der Messdaten bestimmt werden kann. Aus dem Schnittpunkt mit der Y-Achse ergibt sich der Skalierungsfaktor k . Bei einer korrekten Strukturlösung erwartet man, dass die Werte von B -Faktor und Wilson- B -Faktor die gleiche Größenordnung haben.

$$\ln \frac{I_{obs}}{I_{abs}} = \ln k - 2B_{iso} \left(\sin \frac{\Theta}{\lambda} \right)^2 \quad (4.1)$$

Die Werte der Temperaturfaktoren der einzelnen Ketten sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Der durchschnittliche Temperaturfaktor beträgt für die Proteinhauptkette 11.9 \AA^2 , 12.95 \AA^2 für die Seitenketten und 19.6 \AA^2 für die Solvensmoleküle. Dies stimmt gut mit dem aus den Diffraktionsdaten berechneten Wilson- B -Faktor von 9.7 \AA^2 überein. Abb. 4.10 zeigt die Sekundärstrukturdarstellung des SoxCD₁-Protomers gefärbt nach den Temperaturfaktoren der α -Kohlenstoffatome. Die hohe Rigidität der Struktur zeigt sich in den B -Faktoren zwischen 5 und 20 \AA^2 . Es ist deutlich zu erkennen, dass die höheren Temperaturfaktoren (rot) hauptsächlich im Bereich der Termini der beiden Proteine zu finden sind und in einigen Schleifen an der Proteinoberfläche. Insbesondere fällt hier die Schleife zwischen den Resten 184 und 197 von SoxD auf, der die einzige Disulfidbrücke des Proteins enthält. Neben den Proteinketten und den Cofaktoren enthält das SoxCD₁-Modell 959 Wassermoleküle, wobei ausschließlich Wassermoleküle mit einem B -Faktor von 20 \AA^2 oder niedriger modelliert wurden, außerdem zwei Cobaltionen, sechs Calciumionen und neun Glycerinmoleküle (siehe Abb. 4.11). Die Identifizierung der Ionen erfolgte über die chemische Koordination und über die relative Stärke des anomalen Signals im Vergleich mit den Eisenatomen.

Die Stereochemie des SoxCD₁-Modells zeigt weitgehende Übereinstimmung mit den Idealwerten (Engh *et al.*, 1991). Abb. 4.12 zeigt den Ramachandran-Plot der SoxCD₁-Struktur. 97.1 % der Reste liegen in dem bevorzugten Bereich (favoured region) und 2.8 % in dem erlaubten Bereich des Plots. Die einzige signifikante Abweichung von den Torsionswinkelvorgaben des Ramachandran-Plots wird für den Threoninrest 43 von Ket-

te A angegeben. Der Rest ist allerdings durch die Elektronendichte eindeutig festgelegt, wenn diese auch durch die Position am N-Terminus nicht optimal definiert ist

4.8 Bioinformatik/Sequenzanalyse

Mit SoxCD₁ wurde die letzte Proteinstruktur der Enzyme des Thiosulfat-Oxidationszyklus aufgeklärt. Auf dieser Grundlage wurde ein Reaktionsschema entwickelt, das die hohe Substratspezifität von SoxCD erklärt (Zander *et al.*, 2011). Da zahlreiche chemotrophe und phototrophe Bakterien homologe Gene zu dem *Paracoccus pantotrophus*-Sox-Gencluster besitzen (siehe Abb. 1.1), wurden Sequenzanalysen durchgeführt, um zu untersuchen, ob bestimmte Motive der SoxCD₁-Struktur, die für die spezielle Funktion des Enzyms sorgen, in homologen Proteinen ebenfalls vorhanden sind. Hierzu wurden sowohl struktur- als auch sequenzbasierte Vergleiche der Primärstruktur durchgeführt. Eine Suche nach homologen Strukturen von SoxC mittels des DALI-Servers (Holm *et al.*, 2010) ergab 43 Ergebnisse mit 21 % - 28 % Sequenzidentität. Da diese Suchmethode unterschiedliche Ketten derselben Struktur mit gleicher Sequenz als unterschiedliche Ergebnisse betrachtet, ist die Anzahl der tatsächlichen homologen Strukturen in dieser Auswahl wesentlich niedriger. Beschränkt man die Auswahl auf Sulfitoxidasen, erhält man ca. 15 homologe Strukturen zu SoxC. Abb. 5.6 zeigt ein Sequenzvergleich einer Auswahl von SoxC-Homologen. SoxD₁ besitzt eine charakteristische Cytochrom-Faltung, daher werden bei einer Suche nach homologen Strukturen durch den DALI-Server ca. 450 Strukturen mit einer Sequenzidentität von 20 % und mehr gefunden. In Abb. 5.7 ist ein Sequenzvergleich von SoxD₁ und einigen Homologen dargestellt.

Die Identifikation homologer Proteinsequenzen für sequenzbasierte Vergleiche der Primärstruktur wurde über eine Protein-BLAST-Suche (Camacho *et al.*, 2009) durchgeführt. Für SoxC ergab die Suche 94 homologe Proteinsequenzen mit einer Sequenzabdeckung von mehr als 95 %. Von diesen Sequenzen werden 43 als SoxC bezeichnet und 40 als Molybdopterin C Protein. In Abb. 5.14 ist der sequenzbasierte Vergleich einer Auswahl der BLAST-Ergebnisse von SoxC dargestellt.

Für die Suche nach Homologen von SoxD wurde die Wildtyp-SoxD-Sequenz mit zwei Cytochrom-Faltungsdomänen anstelle der SoxD₁-Sequenz verwendet. Die Protein-BLAST-

4 Ergebnisse

Suche ergibt 100 Sequenzen mit einer Sequenzabdeckung von 69 % bis 100 %, von denen 39 als SoxD-Proteine bezeichnet werden. Eine Auswahl dieser Sequenzen ist in Abb. 5.15 gezeigt.

Um eine Aussage über die Signifikanz der *Paracoccus pantotrophus* SoxCD-Reaktion treffen zu können, wurden die SoxY-Sequenzen der Organismen, deren SoxD-Sequenzen in Abb. 5.15 verwendet wurden, ebenfalls für einen Sequenzvergleich verwendet (siehe Abb. 5.16), ebenso wie eine Auswahl von SoxY-Sequenzen mit verkürztem C-Terminus (siehe Abb. 5.17). Die BLAST-Suche nach SoxY-Homologen ergab 100 Sequenzen mit 79 % bis 100 % Sequenzabdeckung.

Um eine genauere Aussage über die Anzahl der bekannten SoxC-, SoxD- und SoxY-Sequenzen zu erhalten, wurde eine Suche in der Protein Sequence Database (Schuler *et al.*, 1996) durchgeführt. Diese ergab 261 Proteinsequenzen für den Suchbegriff SoxC, 312 Sequenzen für den Suchbegriff SoxY und 1190 Sequenzen für den Suchbegriff SoxD. Die eigentliche Anzahl der SoxD-Sequenzen ist deutlich niedriger, da neben Sulfitoxidasen auch die nicht homologe D-Untereinheit der Sarcosinoxidase mit diesem Namen bezeichnet ist.

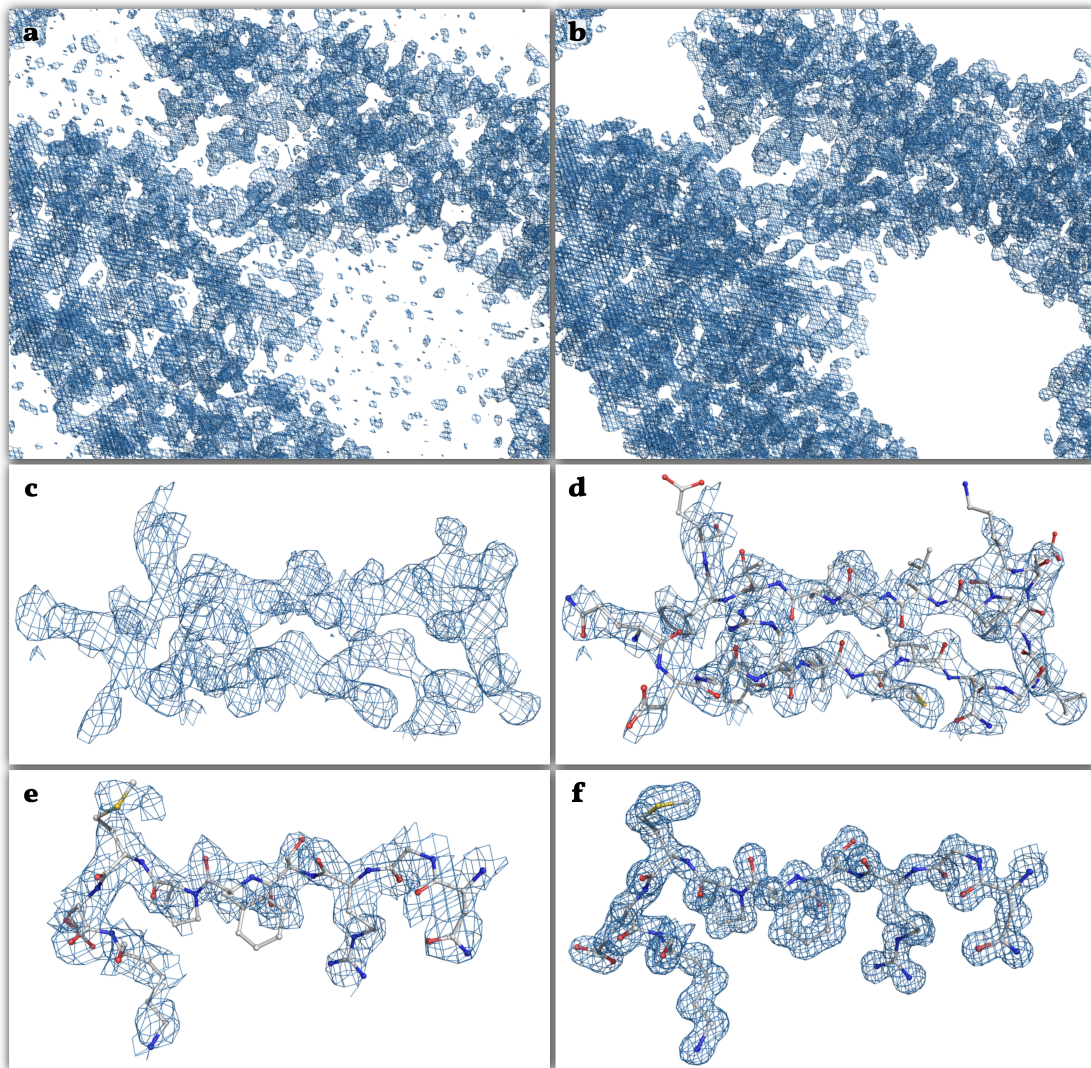


Abb. 4.9: Illustration von Dichtemodifikation, Modellbau und Verfeinerung, dargestellt an $2F_oF_c, \alpha_c$ -Elektronendichtekarten von SoxCD₁. **a.** Vor Dichteoptimierung. Die Lösungsmittelkanäle sind zu erkennen, enthalten allerdings einen hohen Rauschanteil. **b.** Nach Dichteoptimierung. Der Bereich der Lösungsmittelkanäle ist abgeflacht, der Proteinbereich ist deutlicher konturiert. **c.** Elektronendichte ohne Proteinmodell. **d.** Nach Modellbau. Die Elektronendichte, berechnet bis zu einer Bragg-Auflösung von 1.3 Å wurde aufgrund der Primärsequenz interpretiert und mit der Proteinkette „gefüllt“. **e.** Vor Verfeinerung. Die Proteinkette liegt ungefähr an der richtigen Position, ist aber nicht optimal in die Elektronendichte eingepasst. **f.** Durch die Verfeinerungsrechnung werden die Phasen verbessert und die Elektronendichte wird optimiert. Gleichzeitig wird auch die Geometrie des Modells angepasst.

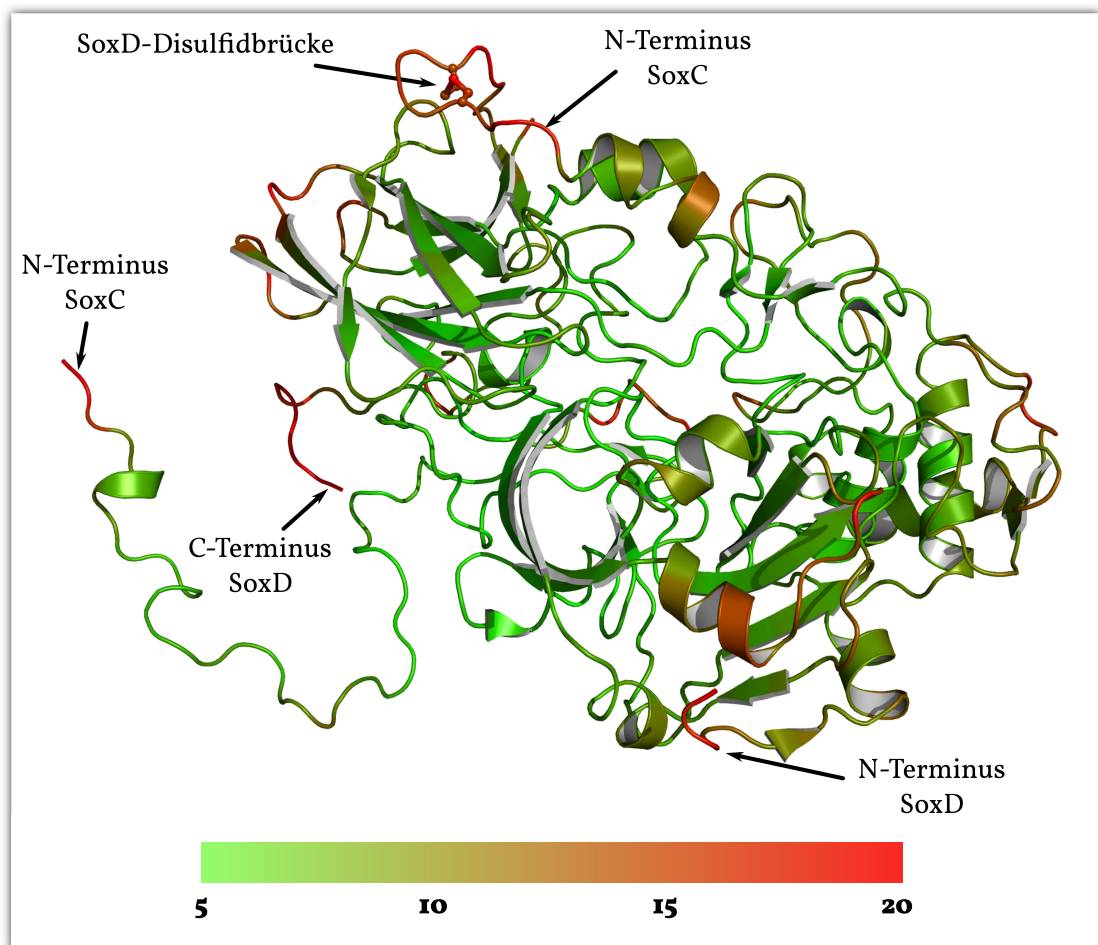


Abb. 4.10: Temperatur-Faktoren des SoxCD₁-Modells. Sekundärstrukturdarstellung eines SoxCD₁-Protomers. Der Balken zeigt den Verlauf der Färbung nach Temperaturfaktor von grün (5 Å²) nach rot (20 Å²)

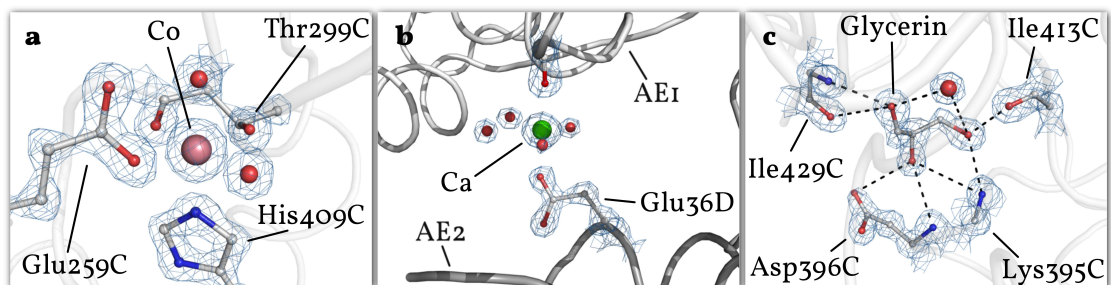


Abb. 4.11: Kristallographische Artefakte in der SoxCD₁-Struktur. a. Cobaltion. Die Koordinations-sphäre wird von den SoxC-Resten Threonin 299, Glutamat 259, Histidin 409 sowie den Wassermolekülen 2199 und 2198 gebildet. b. Calciumion an der Grenzfläche zwischen den SoxCD₁-Molekülen zweier asymmetrischen Einheiten. Die Koordination erfolgt durch die SoxD-Reste Threonin 128 (Kette B, asymmetrische Einheit 1, AE1) und Glutamat 36 (Kette B, asymmetrische Einheit 1, AE1) und vier Wassermoleküle 1280 (asymmetrische Einheit 1, AE1) sowie 766, 810 und 2334 (asymmetrische Einheit 2, AE2). c. Glycerin.

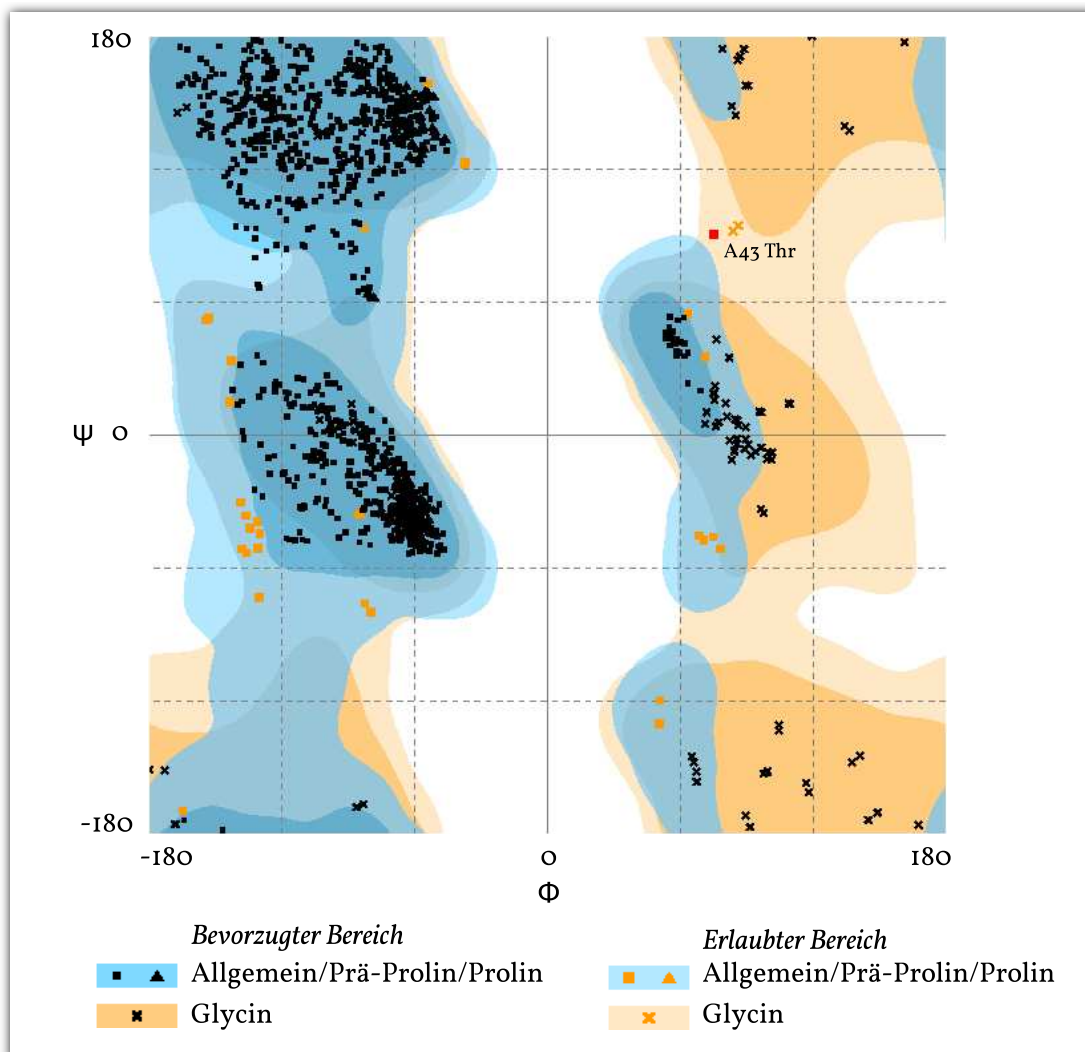


Abb. 4.12: SoxCD₁-Ramachandran-Plot. Reste in bevorzugten Bereichen: 1143 (97.1 %). Reste in erlaubten Regionen: 33 (2.8 %) Reste in verbotenen Regionen: 1 (0.1 %). Erstellt mit PROCHECK (CCP4, 1994).

5 Diskussion

5.1 Probleme bei der SoxCD₁-Strukturaufklärung

Zur Lösung der Diffraktionsgleichung werden die Strukturfaktor-Amplituden, die aus den gemessenen Intensitäten hervorgehen, und die zugehörigen Phasen benötigt. Da für SoxCD₁ kein gutes Homologiemodell vorlag, mussten die Phasen durch experimentelle Methoden gewonnen werden. Sowohl für die isomorphen als auch für die anomalen Phasierungstechniken ist hierbei die Derivatisierung mit „Schweratomen“ die übliche Vorgehensweise. Als Schweratome bezeichnet man hierbei solche Elemente, die wesentlich schwerer sind als die am häufigsten in Proteinen vorkommenden Elemente Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Wasserstoff, d.h. Atome, die eine höhere lokale Elektronendichte aufweisen. Gelingt die Derivatisierung, können entweder aus den isomorphen Differenzen zwischen den Intensitäten eines nativen und eines oder mehrerer Derivatkristalle oder durch die anomalen Differenzen der Bijvoet-Paare bei Messung an der Absorptionskante des eingefügten Elements die Phasen berechnet werden.

In der Praxis ergibt sich hierbei das Problem, dass jede Derivatisierung mit einer Beeinflussung des Kristallgitters verbunden ist. Bei fragilen Kristallen, wie im Falle von SoxCD₁, kann dies dazu führen, dass das Gitter stark gestört wird. Dies wiederum erschwert den Einsatz von isomorphen Methoden, da die Definition von Isomorphie zwischen nativem und derivatisiertem Kristall mit einer Abweichung der Kantenlängen und Winkel der Elementarzelle von maximal 1 % sehr strikt ist.

Im Falle von SoxCD₁ war die Derivatisierung entweder nicht ausreichend, oder sie hatte erhebliche Nonisomorphie zur Folge, wodurch es nicht möglich war, die Phasen mit Derivatkristallen zu lösen. Schweratome, die für die Derivatisierung von SoxCD₁-Kristallen

5 Diskussion

verwendet wurden, waren u.a. Ag, Au, Pt, Hg, u.A. in Form verschiedener wasserlöslicher Salze.

Neben der Derivatisierung kann anomale Phasierung auch über intrinsische anomale Streuzentren des nativen Proteins angewandt werden, wodurch Isomorphieprobleme umgangen werden. Im Falle von SoxCD₁ bieten sich hierfür die Eisen- und Molybdänzentren an. Das anomale Signal kann als prozentualer Anteil der Gesamtstreuung aller Atome in der Elementarzelle betrachtet werden. Die Signalstärke ist abhängig von dem Verhältnis der Zahl der anomalen streuenden Atome und der nicht anomal streuenden Atome. Intrinsische anomale Streuer (Fe, S, Mn) haben im Vergleich zu üblichen Derivaten (Au, Pt, Hg) meist relativ wenige Elektronen, somit ist das von ihnen erzeugte anomale Signal klein.

Abb. 5.1 zeigt den Anteil des theoretisch zu erwartenden anomalen Signals an den Strukturfaktoren für ein Protein von 1200 Aminosäurenresten und zwei Eisenatomen als anomale Streuer pro asymmetrischer Einheit. In der Darstellung ist eine Kurve gezeigt für ein optimistisches Szenario, bei dem das maximale anomale Signal gemessen wird (grün) und eine für ein pessimistisches Szenario, bei dem nur 60 % des anomalen Signals aufgrund von Fehlordnungen im Kristall erreicht wird (blau). Im Idealfall kann demzufolge das anomale Signal bei einer Auflösung von 1.5 Å etwas mehr als 3 % des Gesamtsignals ausmachen. Das bedeutet, dass die Daten einen Fehler von weniger als 3 % haben dürfen um die anomalen Differenzen berechnen zu können, was ungefähr einem R-Faktor von 3 % entspricht.

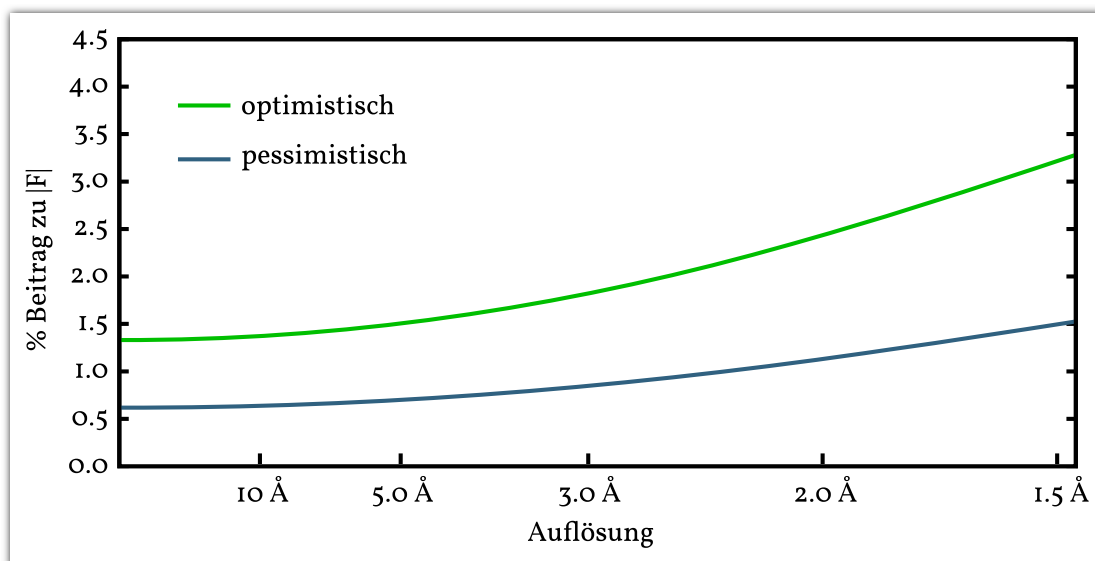


Abb. 5.1: Berechneter Anteil des anomalen Signals für ein SAD-Experiment an der Eisen-K-Kante. Die Berechnung wurde für ein Protein mit 1200 Aminosäureresten und zwei anomalen Streuern pro asymmetrischer Einheit durchgeführt. Optimistisches Szenario (grüne Kurve): 100 % des zu erzielenden anomalen Signals. Pessimistisches Szenario (blaue Kurve): 60 % der anomalen Streuer im Kristall sind geordnet. Der Fehler des Betrags der Strukturfaktoren sollte kleiner sein als das zu erwartende anomale Signal. Dieser kann bei der Datenmessung über die R-Faktoren abgeschätzt werden

Tab. 5.1: Prozessierung von SoxCD₁-Diffraktionsdaten. Auszug aus den XSCALE.LP-Dateien des Skalierungsprogramms XSCALE (Kabsch, 2010). Der Datensatz 172 wurde an der Beamline X12 (DESY, Hamburg) gemessen, der Datensatz *x5* wurde an der Beamline ID23-1 (ESRF, Frankreich) gemessen und verwendet um die Struktur zu lösen.

Auflösung	Vollständigkeit		R-Faktor ¹		I/Sigma ²		R _{meas} ³		anomale Korrelation ⁴	
	172	<i>x5</i>	172	<i>x5</i>	172	<i>x5</i>	172	<i>x5</i>	172	<i>x5</i>
10.0	99.2 %	98.2 %	3.9 %	3.6 %	41.34	59.70	4.3 %	3.7 %	88 %	64 %
8.0	99.3 %	98.4 %	4.2 %	3.8 %	37.26	55.90	4.6 %	4.0 %	56 %	56 %
6.0	98.6 %	98.5 %	5.2 %	4.4 %	30.15	47.77	5.7 %	4.6 %	45 %	57 %
4.0	81.5 %	97.5 %	7.0 %	4.2 %	22.05	48.39	7.7 %	4.4 %	19 %	32 %
total	86.6 %	97.7 %	5.9 %	4.2 %	25.42	49.43	6.5 %	4.4 %	39 %	41 %

$$^1 R = \frac{\sum I_{h,i} - I_h}{\sum I_{h,i}}$$

² durchschnittliche Signalstärke

³ redundanzunabhängiger R-Faktor

⁴ durchschnittlicher Korrelationsfaktor der anomalen Differenzen

Die erfolgreiche Strategie für die experimentelle Phasierung der SoxCD₁-Daten war die Messung des intrinsischen anomalen Signals mithilfe eines hochbrillianten Synchrotron-

Röntgenstrahles mit sehr kleinem Durchmesser, wie er an der Beamline ID23-1 des ESRF (Grenoble, Frankreich) vorhanden ist. Alle zuvor durchgeführten Diffraktionsexperimente fanden an Beamlines mit wesentlich größerem Strahldurchmesser statt (z.B. DESY X12, BESSY MX14-2). In Tabelle 5.1 sind Auszüge aus den Prozessierungsstatistiken des Datenskalierungsprogrammes XSCALE (Kabsch, 2010) für zwei unterschiedliche SoxCD₁-Datensätze gezeigt. Der Datensatz „172“ wurde an der Beamline X12, DESY, gemessen und der Datensatz „x5“, der für die erfolgreiche Phasierung der SoxCD₁-Struktur verwendet wurde, an der Beamline ID23-1, ESRF. An der Statistik ist zu erkennen, dass die Datenqualität des „x5“-Datensatzes etwas besser ist: die R-Faktoren sind niedriger, die Signalstärke und anomale Korrelation sind höher. Die Beträge der R-Faktoren des „x5“-Datensatzes sind etwas höher als die oben angegebenen 3 %. Dennoch war die Berechnung der Phasen dieses Datensatzes erfolgreich, da neben den Eisenzentren die Molybdänatome und, in sehr geringem Maße, die Schwefelatome, Calciumatome, Phosphoratome und Manganatome zu dem anomalen Gesamtsignal beigetragen haben, wodurch die Signalstärke größer als der Fehler der Messung war.

Ein weiterer Grund, warum die „172“-Messung keine Phasenwerte liefern konnte, ist der Durchmesser des verwendeten Röntgenstrahls. Die SoxCD₁-Kristalle weisen starke Verzwillingung auf. Bei diesem Effekt besteht ein Kristall aus zwei oder mehreren Domänen, die in unterschiedliche Richtungen orientiert sind, wodurch das Diffraktionsbild sich aus unterschiedlichen, aber perfekt überlagernden Diffraktionsmustern zusammensetzt. Die Konsequenz ist, dass die anomalen Differenzen erheblich reduziert werden. Der Strahldurchmesser der Beamline X12 (2 mm x 0.4 mm) bedingte, dass die Diffraktion über den gesamten SoxCD₁-Kristall gemessen wurde, wodurch die Abschwächung des anomalen Signals durch Verzwillingung vollständig zum Tragen kam. Der Versuchsaufbau der ESRF-Beamline ermöglicht es, mit einem Strahldurchmesser von 30 x 40 μm einen sehr kleinen Bereich auf dem Kristall zu fokussieren und somit Daten zu messen, die (fast) nur von einer Twindomäne stammten. Als Konsequenz waren die anomalen Differenzen stark genug, um die Phasen zu generieren.

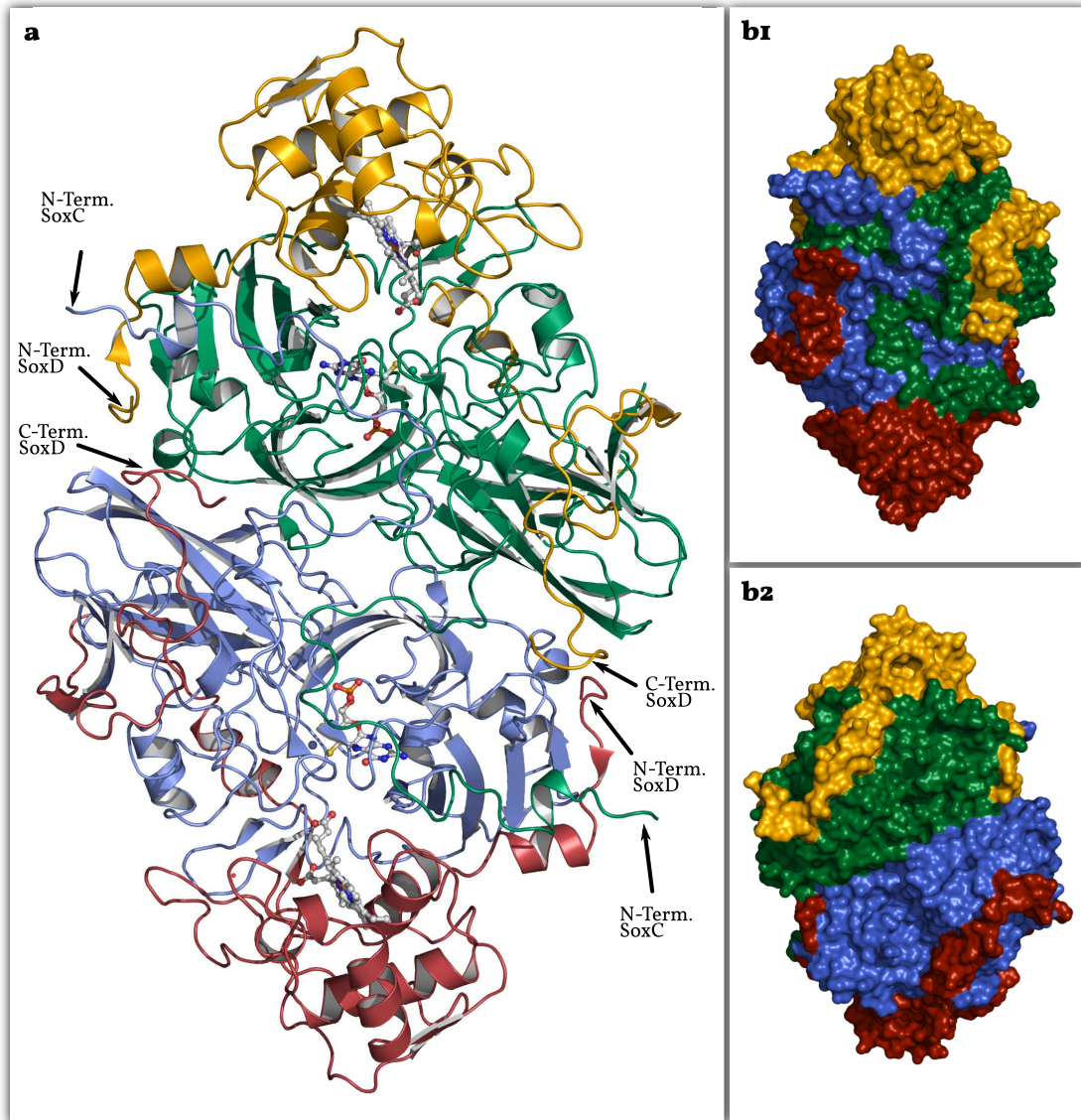


Abb. 5.2: SoxCD₁-α2β2-Heterotetramer. **a.** Sekundärstrukturdarstellung. **b1, b2.** Oberflächendarstellung der Vorder- und Rückseite des Proteins. Grün/blau: SoxC, molybdänbindende Untereinheiten. Gelb/rot: SoxD, hämbindende Untereinheiten.

Tab. 5.2: Berechnete Kontaktflächen der SoxCD₁-Struktur. Die Berechnung wurde mit dem Programm PISA (Krissinel *et al.*, 2007) auf Grundlage der Proteinstruktur durchgeführt.

Interface-Nr.	Struktur1		Struktur2		Kontaktfläche	CSS
	Kette	Reste	Kette	Reste		
1	C	123	D	93	4101.8	0.722
	A	122	B	96	4101.8	0.722
	<i>Durchschnitt:</i>				4101.4	0.722
2	C	101	A	100	3941.9	1.0
3	B	24	C	20	752.3	0.45
	D	24	A	20	749.1	0.5
	<i>Durchschnitt:</i>				750.7	0.46
4	B	21	D	21	557.4	0

5.2 Quartärstruktur

Der biologisch funktionsfähige SoxCD₁-Proteinkomplex ist als $\alpha 2\beta 2$ -Heterotetramer aufgebaut. Die SoxCD₁-Protomere sind über eine zweizählige Symmetrieachse verknüpft: die Kontaktfläche zwischen zwei Protomeren wird durch die SoxC-Proteine aufgebaut, während die SoxD-Proteine distal angeordnet sind (siehe Abbildung 5.2 a). Die C-Termini der SoxC-Proteine zeigen eine Schleifenstruktur und ragen weit aus dem Bereich der kompakten Faltung der Untereinheit über das benachbarte Protomer hinaus. Das gleiche gilt für die C-Termini von SoxD₁. Sie erstrecken sich ebenfalls in Proteinbereiche außerhalb der Cytochromdomäne (siehe Abbildung 5.2 b, c). Aufgrund der Ausdehnung der c-terminalen Enden der Proteinketten sind die Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten, die zur Stabilität des Komplexes beitragen, außergewöhnlich groß. Sie betragen sowohl zwischen den beiden Protomeren als auch zwischen SoxC und SoxD₁ ca. 4000 Å², siehe Tabelle 5.2.

Ein Proteinkomplex gilt als stabil, wenn die Kontaktfläche zwischen seinen Untereinheiten größer ist als 1500 Å² (Jones *et al.*, 2000). Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei SoxCD₁ um einen sehr festen Komplex handelt und es sehr unwahrscheinlich ist, dass die Protomere in funktionsfähigem Zustand voneinander getrennt werden können. Dies ist insofern bedeutsam, als man vor Aufklärung der Kristallstruktur davon ausging, dass die SoxD₂-Domäne des Wildtyp-Proteins Sox(CD)₂ für die Tetramerisierung des Komplexes sorgt (Bardischewsky *et al.*, 2005) und SoxCD₁ im Gegensatz dazu ein Dimer

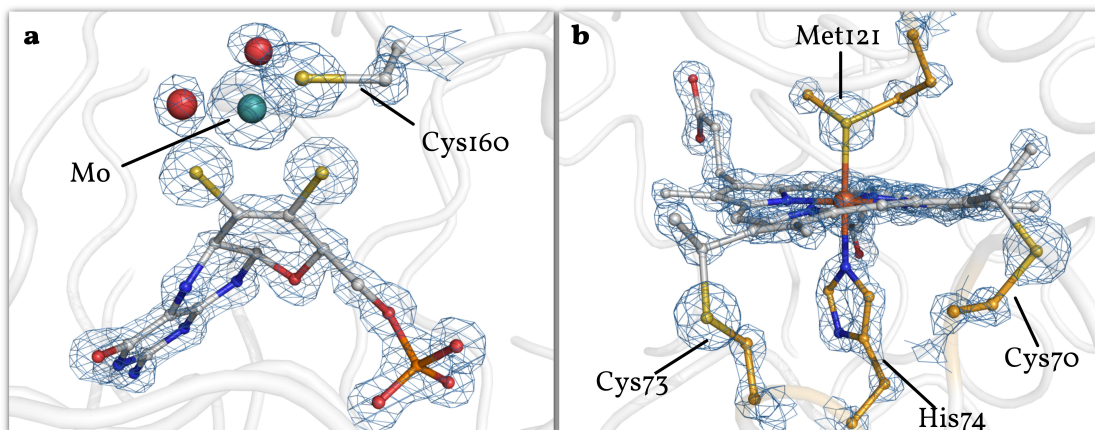


Abb. 5.3: SoxCD₁-Cofaktoren mit Elektronendichte. **a.** SoxC-Molybdäncofaktor. **b.** SoxD₁-Hämcofaktor. Die $2F_oF_c$, α_c -Elektronendichtekarte der Cofaktoren ist als blaues Netz dargestellt, die Konturierung der $2F_oF_c$, α_c -Elektronendichtekarte beträgt 3σ .

ausbildet. Dies ist eine Annahme, die sowohl von der Kristallstruktur von SoxCD₁ als auch durch die kombinierte HPLC-MALLS-Analyse korrigiert wurde.

5.3 Cofaktoren

Molybdän-Cofaktor

Das Molybdän im Cofaktor wird neben den beiden Thiolaten des Molybdopterin von der Seitenkette des Cysteins 160 von SoxC koordiniert (siehe Abb. 5.3 a). Die restlichen beiden Koordinationsstellen sind mit Sauerstoff besetzt, der als Hydroxo- oder Oxogruppe vorliegt. Somit gehört der Cofaktor von SoxC zum Sulfitoxidase-Typ (Hille, 2002).

Häm-Cofaktor

Der Porphyrinring trägt an Position 3 und 7 Isopropylthiol-Reste, die über Disulfidbindungen mit den Cysteinresten 70 und 73 von SoxD₁ verknüpft sind (siehe Abb. 5.3 b).

5 Diskussion

Damit handelt es sich um einen Häm-C-Cofaktor, der typisch für Proteine mit Cytochrom *c*-Faltung ist (siehe Abb. 5.4). Die axiale Koordination des Eisen-Atoms erfolgt durch Methionin 121 und Histidin 74 von SoxD₁. Freie Hämgruppen in Lösung sind stets planar, der Häm-Cofaktor von SoxD₁ dagegen zeigt eine Verdrillung: der größte Winkel zwischen zwei gegenüberliegenden Kohlenstoffatomen des Porphyrinrings beträgt 172.7 °.

Diese Verzerrung der Häm-Geometrie wird durch die Thioether-Bindung der beiden Cysteinseitenketten induziert und durch die Tertiärstruktur der Cytochrom-*c*-Faltung bedingt (Hobbs *et al.*, 1995). Die biologische Funktion einer solchen Häm-Form kann die Veränderung des Redoxpotentials des Proteins oder bestimmte Bindungseigenschaften gegenüber Liganden sein.

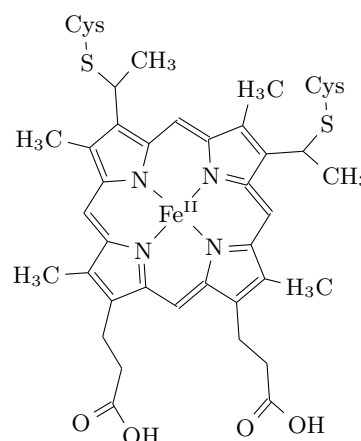


Abb. 5.4: Häm-C-Strukturformel

5.4 Tertiärstruktur und Faltungsdomänen

SoxC besteht aus zwei Domänen, die auch bei homologen Proteinen gefunden wurden. Die N-terminal liegende Domäne (Reste 72-243) bindet den Molybdäncofaktor und kommt in Xantindehydrogenase (Battelli *et al.*, 1982), Aldehydoxidase (Huang *et al.*, 1999), Nitratreduktase (Berks *et al.*, 1995) und Sulfitoxidase (MacLeod *et al.*, 1961) vor. Die C-terminal liegende Moco-Dimerdomäne (Reste 256-376) wurde ebenfalls in Oxidoreduktasen, die einen Molybdäncofaktor besitzen, gefunden. Sie beinhaltet ein immunglobulinartiges Faltungsmotiv (Reste 200-318) und ist an der Dimerisierung beteiligt. Die Bereiche der Faltungsdomänen sind in den Sequenzalignments von SoxC markiert (siehe Abb. 5.6 und 5.14).

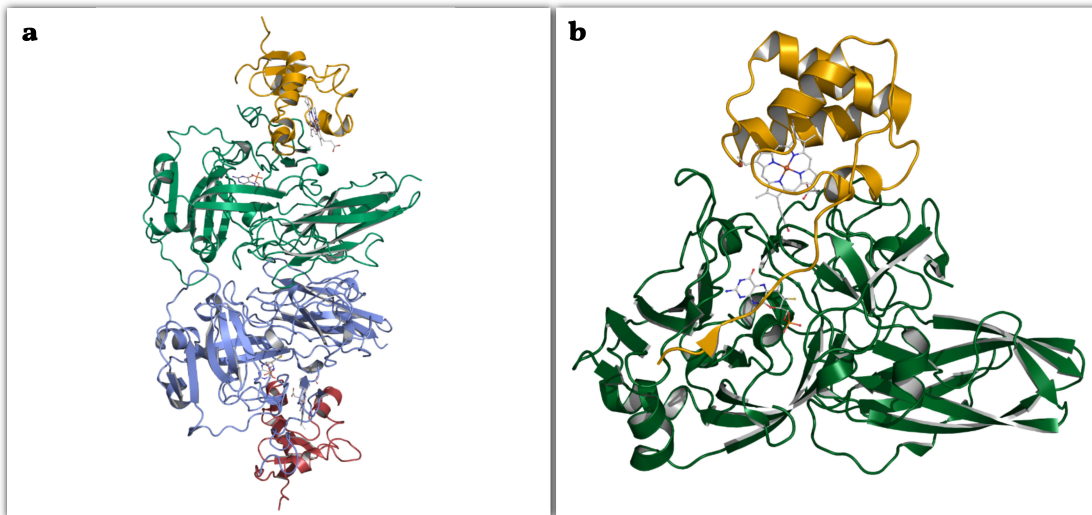


Abb. 5.5: Kristallstrukturen der SoxCD₁-homologen Molybdohämoenzyme. **a.** Chicken Sulfite Oxidase CSO (Kisker *et al.*, 1997, PDB-Eintrag 1SOX). **b.** Sulfite dehydrogenase SorAB aus *Starkeya novella* (Kappler *et al.*, 2005, PDB-Eintrag 2BLF)

5.5 Strukturbasierter Vergleich von SoxCD₁ mit homologen Proteinen

In der Proteindatenbank (Berman *et al.*, 2000) sind Sulfitoxidasen zu finden, die eine molybdänbindende Domäne aufweisen und deren Faltung homolog zu SoxC ist, z.B. die Nitratreduktase aus *Pischia angusta* (Fischer *et al.*, 2005, PDB-Eintrag 2BII) und die Sulfitoxidase aus *Arabidopsis thaliana* (Schrader *et al.*, 2003, PDB-Eintrag 1OGP). Im Gegensatz dazu findet man eine Vielzahl homologer Strukturen zu dem cytochromartigen SoxD₁.

Neben SoxCD₁ sind bisher erst zwei weitere Proteinstrukturen aufgeklärt, die sowohl Molybdäncofaktoren als auch Hämgruppen enthalten. Hierbei handelt es sich um die Sulfitoxidase CSO aus *Gallus gallus* (Kisker *et al.*, 1997, PDB-Eintrag 1SOX) und die Sulfite dehydrogenase SorAB aus dem Bakterium *Starkeya Novella* (Kappler *et al.*, 2005, PDB-Eintrag 2BLF, siehe Abb. 5.5). Abb. 5.6 zeigt ein strukturbasiertes Alignment der Proteinsequenzen der genannten SoxC-Homologen, Abb. 5.7 zeigt ein Alignment der SoxD-Homologen. Diese beiden Enzyme zeigen einen deutlichen Unterschied in ihrer Biochemie im Vergleich zu SoxCD. Sowohl CSO als auch SorAB sind in der Lage, freies

5.5 Strukturbasierter Vergleich von SoxCD₁ mit homologen Proteinen

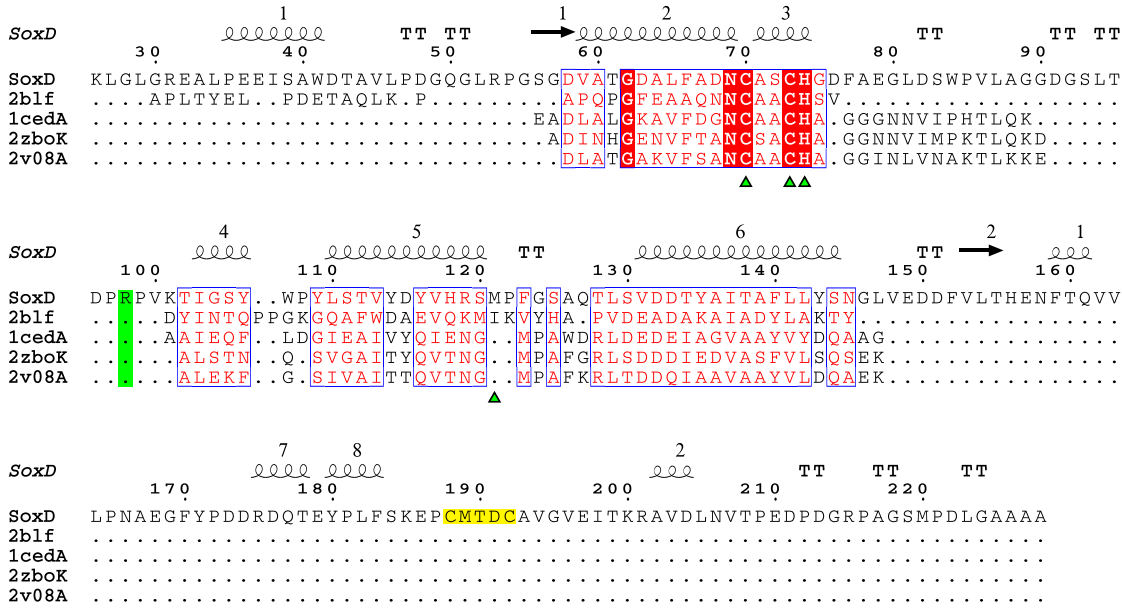


Abb. 5.7: Strukturbasiertes Sequenzalignment von *Paracoccus pantotrophus*-SoxD und homologen hämbindenden Proteinen. 2blf: Sulfithydrogenase SorAB aus *Starkeya Novella* (Kappler *et al.*, 2005). 1ced: Cytochrom *c6* aus *Monoraphidium braunii* (Banci *et al.*, 1996). 2zbo: Cytochrom *c6* aus *Hizikia fusiformis* (Akazaki *et al.*, 2008). 2v08: Cytochrome *c6* aus *Phormidium laminosum* (Worrall *et al.*, 2007). Das strukturbasierte Alignment wurde mit DALI (Holm *et al.*, 2010) durchgeführt. Das endgültige Bild wurde mit ESPript (Gouet *et al.*, 2003) erstellt. Für die Signifikanz der Ähnlichkeiten (similarity score) wurden die Einstellungen 0.3 0.8 R verwendet. Oberhalb der Sequenzen sind die Sekundärstrukturelemente α-Helix (Spirale), β-Faltblatt (Pfeil) und β-Schleife (TT) eingezeichnet. Identische Aminosäurereste (similarity score > 0.3) sind in weißer Schrift auf rotem Hintergrund dargestellt, ähnliche Reste (similarity score < 0.3) durch rote Schrift in blauer Umrandung. Die Nummerierung entspricht der SoxD-Sequenz. Der Argininrest 98 ist durch grüne Unterlegung gekennzeichnet, das Disulfidbrückenmotiv CMTDC ist durch einen gelben Balken hinterlegt. Die Aminosäuren, die den Häm-Cofaktor koordinieren, sind mit grünen Dreiecken unterhalb der Sequenz markiert.

Sulfit zu Sulfat zu oxidieren. SoxCD benötigt als Substrat SoxYZ-Cys110-Persulfid und ist nicht in der Lage, freies Schwefelsubstrat umzusetzen.

Die Quartärstruktur von CSO ähnelt auf den ersten Blick der von SoxCD₁, es handelt sich hierbei allerdings um ein Homodimer, die molybdänbindende Domäne und die hämbindende Domäne liegen in einer Polypeptidkette. Die beiden Domänen zeigen die gleichen konservierten Faltungsmuster anderer molybdänbindender bzw. hämbindender Proteine (siehe Abb. 5.5 a). SorAB bildet ein Dimer aus dem molybdänbindenden Protein SorA und dem hämbindenden SorB und ähnelt in seinem Aufbau einem SoxCD₁-Protomer (siehe Abb. 5.5 b).

In SoxCD, SorAB und CSO ist Molybdän der primäre Elektronenakzeptor. Nach einer Elektronenübertragung von dem Substrat auf das Molybdän müssen die Elektro-

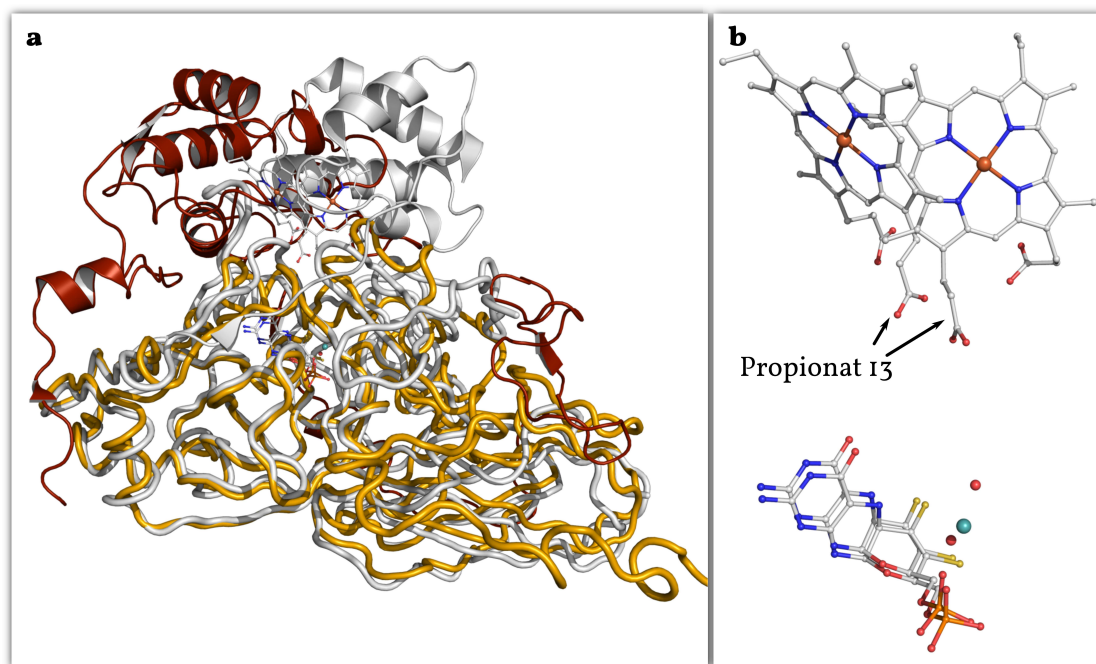


Abb. 5.8: Strukturbasiertes Alignment von SorAB und einem SoxCD₁-Protomer. a. Sekundärstrukturdarstellung der Proteinhauptkette, gelb: SoxC, rot: SoxD₁, grau: SorAB. b. Position der Cofaktoren von SorAB und SoxCD₁ in dem strukturellen Alignment.

nen auf die Hämgruppe übertragen werden, um den Ausgangszustand des Molybdän-Reaktionszentrums wiederherzustellen. Diese Elektronenübertragung kann nur stattfinden, wenn der Abstand zwischen den beiden Cofaktoren ausreichend klein ($< 14 \text{ \AA}$, Page *et al.*, 1999) ist. Aus diesem Grunde wurde postuliert, dass die CSO Struktur einen nichtfunktionsfähigen Zustand des Proteins zeigt, da die Distanz zwischen den Cofaktoren ca. 30 \AA beträgt. Daher wird ausschließlich die Struktur von SorAB für funktionelle Vergleiche mit SoxCD₁ herangezogen, da in beiden Kristallstrukturen die Abstände der Reaktionszentren ca. 15 \AA betragen.

Abb. 5.8 a zeigt ein strukturelles Alignment von SorAB und einem SoxCD₁-Protomer. Die Faltung der molybdänbindenden Proteine ist sehr ähnlich. Das Gleiche gilt für die Faltung der hämbindenden Proteine, deren Position sich allerdings relativ zu den molybdänbindenden Proteinen unterscheidet.

Wie in Abb. 5.8 b zu sehen ist, sind die Distanzen zwischen Molybdäncofaktoren und Hämgruppen nahezu identisch. Außerdem befindet sich der Propionatrest 13 der Häm-

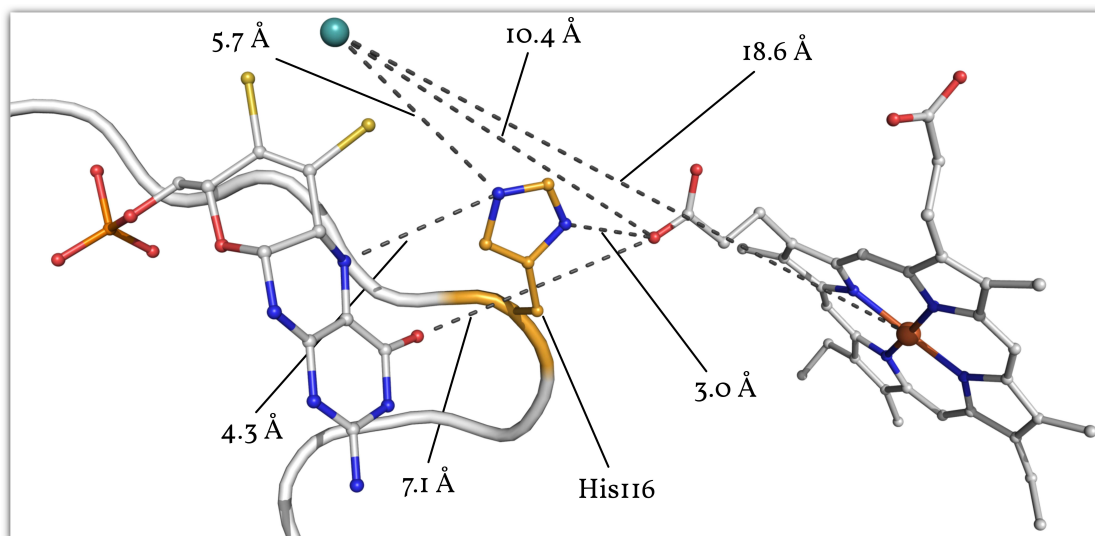


Abb. 5.9: Cofaktorendistanzen im SoxCD₁-Protomer. Die Distanzwerte zwischen Häm und Molybdän-Cofaktor befinden sich unterhalb der maximalen Electron-Tunnelling-Distanz von 14 Å. Zwischen den beiden Cofaktoren befindet sich der Histidinrest 116, der möglicherweise eine Rolle bei der Elektronenübertragung zwischen den Cofaktoren spielt.

gruppen in beiden Proteinen an der gleichen Position, was darauf hinweist, dass dieser Rest an der Elektronenübertragung beteiligt sein kann.

Zwischen Redoxzentren in Proteinen können Elektronen durch „Electron Tunneling“ übertragen werden, wenn die Distanz zwischen den Zentren weniger als 14 Å beträgt (Page *et al.*, 1999). Durch die Geometrie der Proteinumgebung wird ein Elektronentransfer ermöglicht, der mit wesentlich höherer Geschwindigkeit abläuft als die eigentliche Redoxreaktion des Substrates. „Electron Tunneling“ funktioniert ohne erkennbare zusätzliche Strukturen, während Elektronentransfers über größere Entfernungen innerhalb eines Proteins über Ketten von Cofaktoren und zwischengeschalteten Aminosäuren ablaufen. Im Falle von SoxCD₁ beträgt die Distanz zwischen Molybdän und Eisen 18.6 Å, und der geringste Kantenabstand der Cofaktoren, der wahrscheinlich relevant für den „Electron Tunneling“-Effekt ist, 7.1 Å (siehe Abb. 5.9). Zwischen Häm und Molybdän-Cofaktor befindet sich ein Histidinrest (His116 von SoxC), der an der Koordination des Molybdän-Cofaktor beteiligt ist und ebenfalls für die Elektronenübertragung in einem alternativen Mechanismus in Frage kommen könnte.

5.6 Interpretation des Proteinmodells

5.6.1 SoxYZ-Abhängigkeit

Die hohe Substratspezifität von SoxCD und die Abhängigkeit der Reaktion von dem Transportprotein SoxYZ kann im Vergleich mit der Struktur von SorAB erklärt werden. In den berechneten Oberflächen beider Proteinmodelle sind tunnel- bzw. trichterartige Strukturen zu erkennen, die von der Proteinoberfläche in Richtung des Molybdäns verlaufen. Die berechnete elektrostatische Oberfläche beider Proteine weist an diesen Eingängen ein positives Potential auf, während der Rest der Proteine weitgehend negativ ist (siehe Abb. 5.10 a, c). Dies korreliert mit der Tatsache, dass es sich bei den Substraten beider Proteine um Anionen handelt, Sulfit im Falle von SorAB und SoxY-Cys110-Persulfid im Falle von SoxCD. Ein genauerer Blick auf die Beschaffenheit der Eingänge zeigt zwei entscheidende Unterschiede: Der Substrattrichter von SoxCD₁ ist wesentlich enger als die Substratbindestelle von SorAB, die eher einer Tasche ähnelt (siehe Abb. 5.10). Zusätzlich ragt eine Argininseitenkette (SoxD-Arg98) direkt vor den Substrattunnel von SoxCD₁, wo sie wie eine Schranke wirken kann. Da das Substrat an den c-terminalen Bereich von SoxY gebunden ist, ist ein Szenario vorstellbar, bei dem der negativ geladene C-Terminus von SoxY in Wechselwirkung mit der Argininseitenkette tritt, um den Eingang zu dem Tunnel zu „öffnen“ und das Schwefelsubstrat in räumliche Nähe des Molybdänsatoms zu bringen. Mithilfe des PyMOL-Plugins „Caver“ wurde die Ausdehnung der Substratbindetasche modelliert (siehe Abb. 5.11 a). Ein Modell des „*Swinging Arms*“ von SoxY (Aminosäuresequenz: VTIGGCGG-COOH) wurde erstellt und durch eine Verfeinerungsrechnung, die die sterische Ausdehnung der Atome berücksichtigt, so in die Tasche eingepasst, dass sich das äußere Schwefelatom des Cys-Persulfides möglichst nahe am Molybdän und der C-Terminus sich innerhalb der Salzbrückendistanz zu Arginin98 von SoxD₁ befindet (siehe Abb. 5.10 b). Diese einfache Modellierung zeigt, dass die oben gemachte Annahme über die Gründe für die SoxYZ-Abhängigkeit von SoxCD plausibel sind. Zur Untermauerung dieser These könnte die Cokristallisation von SoxCD₁ und dem synthetisierten „Swinging Arm“ und die anschließende Strukturaufklärung durchgeführt werden. Desweiteren könnte auf molekularbiologischer Ebene versucht werden, durch die Mutation von Arg98 in eine sterisch weniger raumgreifende Aminosäure die Substratspezifität zu verändern. Es wäre denkbar, dass SoxCD durch diese Mutation freies Sulfit

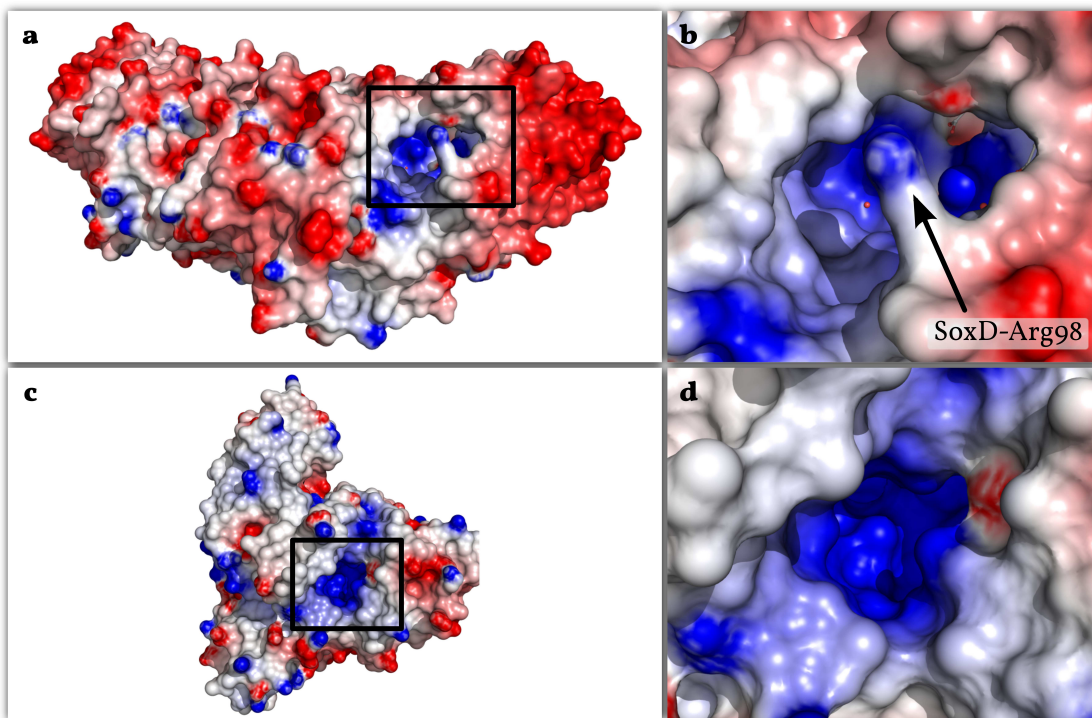


Abb. 5.10: SoxCD₁/SorAB: Proteinoberflächendarstellung des elektrostatische Potentials. **a.** Gesamtansicht des SoxCD₁-Heterotetamers. **b.** Ausschnittsvergrößerung. Der SoxCD₁-Substratbindetrichter verläuft in Richtung des Molybdäncofaktors und wird von der Argininseitenkette 98 von SoxD₁ blockiert. **c.** Gesamtansicht des SorAB-Heterodimers. **d.** Ausschnittsvergrößerung. Die SorAB-Substratbindetasche hat einen größeren Durchmesser und ist offen. Die elektrostatischen Oberflächenpotentiale wurden mit Delphi (Rocchia *et al.*, 2002) berechnet und die Connolly-Proteinoberfläche entsprechend eingefärbt (rot: negativ, blau: positiv, Gradient: ± 7 kT/e).

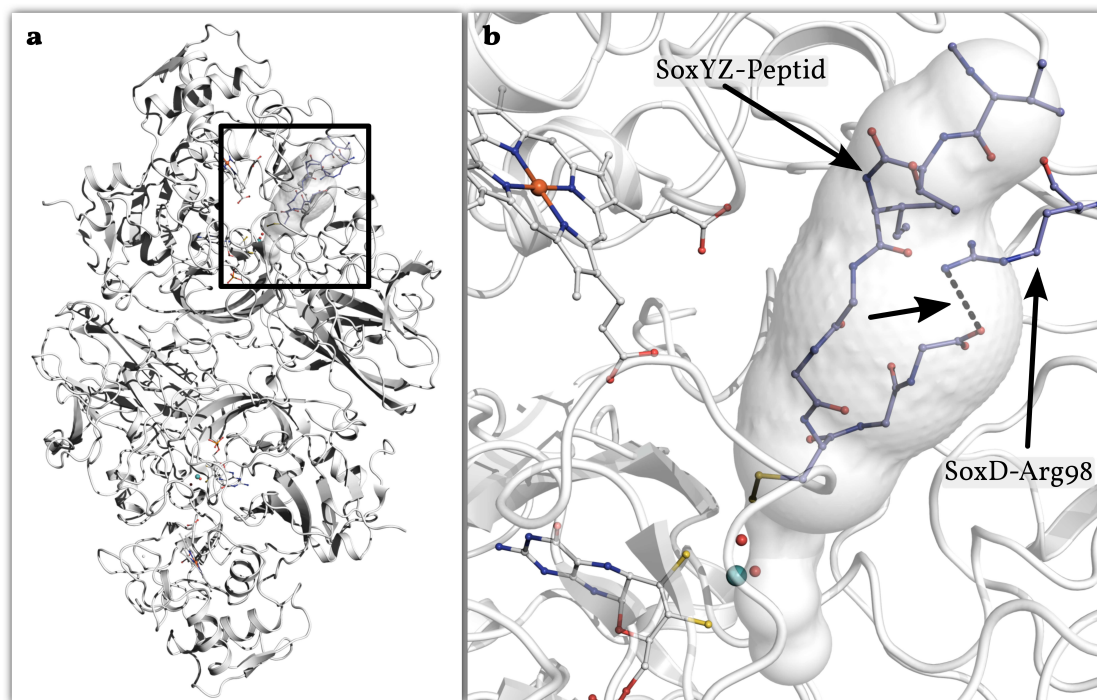


Abb. 5.11: Potentielle Substratbindetasche von SoxCD₁. **a.** Gesamtansicht des SoxCD₁-Heterotetramers. **b.** Ausschnittvergrößerung. Die Sekundärstrukturdarstellung der Proteinkette und die Stäbchenmodelle der Cofaktoren sind in weiß dargestellt. Das Peptid VTIGGCGG-COOH, das den c-terminalen „Swinging Arm“ von SoxY darstellt, wurde in die Bindetasche modelliert und ist als Stäbchenmodell in blau dargestellt. Dem Peptid überlagert ist die mit dem Programm Caver (Petrek *et al.*, 2006) berechnete Oberfläche der Bindetasche, dargestellt in transparentem weiß. Die Salzbrücke zwischen dem SoxY-C-Terminus und SoxD-Arg98 ist mit einem Pfeil hervorgehoben.

oxidieren kann, eventuell kann dann aber auch SoxYZ nicht mehr an SoxCD binden, da die Wechselwirkung zwischen Arg98 und dem C-Terminus von SoxY verloren geht.

5.6.2 Übertragung von sechs Elektronen in einem Reaktionsschritt

Wie in der Einleitung erwähnt, ist die Übertragung von sechs Elektronen in einer Abfolge von gekoppelten Reaktionsschritten innerhalb eines aktiven Zentrums ein in der Natur ausgesprochen selten zu beobachtender Vorgang, der für wenige distinkte Enzymklassen beschrieben ist.

Im Zusammenhang mit der Postulierung des Thiosulfat-Oxidationszyklus wurde festgestellt, dass SoxCD ebenfalls eine sechs-Elektronen-Transferreaktion katalysiert. Für

Sulfitoxidasen konnte aufgrund von ESR-Messungen ein Reaktionsmechanismus erstellt werden, der auf der Übertragung der lateralen Oxogruppe des Molybdäncofaktors auf das Substrat beruht (Hille, 2002). Hierbei wechselt der Oxidationszustand des Molybdäns zwischen +IV und +VI. Dieser Mechanismus war die Grundlage für ein Reaktionsschema für SoxCD, das unter der Berücksichtigung der kovalenten Bindung des Schwefelsubstrates und der Gesamtübertragung von sechs Elektronen erstellt wurde. Abb. 5.12 zeigt die Intermediate der Oxidation von SoxY-Cys110-Persulfid zum SoxY-Cys110-S-Sulfonat.

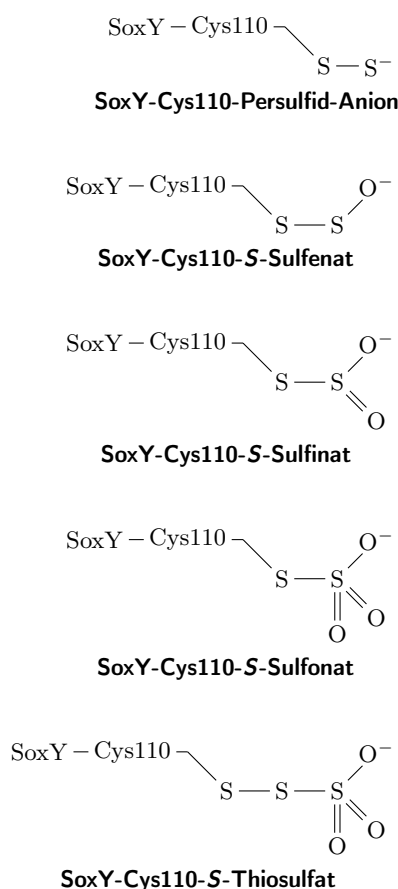


Abb. 5.12: Substrate des Sox-Zyklus, Intermediate der SoxCD-Reaktion.

Sauerstoff des Molybdänzentrums an das endständige Schwefelatom gebunden. Ein Wassermolekül ersetzt das übertragene axiale Sauerstoffatom des Molybdän-Reaktionszentrums, die erste Oxidation des Substrates ist durch die Bildung von SoxY-Cys110-S-Sulfenat abgeschlossen. Durch die Abführung von zwei Elektronen wird der +VI-Oxidationszustand

Das vorliegende Reaktionsschema beruht auf den biophysikalischen Untersuchungen der Sulfitoxidase (Hille, 1994). In dieser Arbeit wurden mit Elektronenspinresonanz (ESR) und Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) verschiedene Zustände des Reaktionszentrums des Enzyms detektiert und auf dieser Grundlage ein Reaktionsmechanismus entworfen. Dieser Mechanismus wurde als Vorlage für das Reaktionsschema für die Oxidation von SoxY-Cys110-Persulfid zu SoxY-Cys110-S-Sulfonat durch SoxCD verwendet (siehe Abb. 5.13).

Im ersten Schritt der Reaktion tritt der C-Terminus von SoxY in Wechselwirkung mit dem Argininrest 98 von SoxD. Hierdurch wird der „Eingang“ des Substrattrichters freigegeben und das SoxY-Cys110-Persulfid gelangt in räumliche Nähe zu dem Molybdän-Reaktionszentrum. Durch einen nucleophilen Angriff wird das endständige Schwefelatom des SoxY-Cys110-Persulfides an das Molybdän gebunden. Dabei wird der Oxidationszustand des Molybdäns von +VI zu +IV geändert. Durch eine Umlagerung wird der axiale

des Molybdäns wiederhergestellt. Anschließend wird wiederum das axiale Sauerstoffatom des Molybdän-Reaktionszentrums auf das endständige Schwefelatom des Substrates übertragen, wodurch SoxY-Cys110-*S*-Sulfinat gebildet wird. Durch die Addition eines Wassermoleküls und der Abführung von zwei Elektronen wird wiederum das Reaktionszentrum regeneriert. Dieser Schritt der Übertragung eines Sauerstoffatoms mit anschließender Regenerierung des Reaktionszentrums läuft ein drittes Mal ab, wobei SoxY-Cys110-*S*-Sulfonat gebildet wird, von dem im nächsten Schritt des Thiosulfat-Oxidationszyklus durch SoxB ein Sulfatanion abgespalten wird.

Das Besondere hierbei ist, dass das Schwefelsubstrat durch seine Bindung an SoxY solange im aktiven Zentrum fixiert bleibt bis die Oxidation vollständig abgelaufen ist.

5.7 Sequenzbasierter Vergleich: Sox-Proteine

SoxC. Die Gene und Proteine des Sox-Systems sind in den Genomen und Proteomen schwefeloxidierenden Bakterien weit verbreitet. Eine Protein-BLAST-Suche nach homologen Sequenzen zu SoxC ergibt 94 Ergebnisse mit einer Sequenzabdeckung von mehr als 95 %, von denen 43 als SoxC bezeichnet sind und 40 als Molybdopterin C Protein. Auffällig hierbei ist, dass die Sequenzen der Proteine SorA und der Sulfitoxidase aus *Gallus gallus*, die die einzigen bekannten strukturell homologen Proteine zu SoxCD darstellen, in dem Ergebnis der BLAST-Suche nicht vorhanden sind, da die Ähnlichkeit der Sequenzen beider Proteine zu SoxC eher gering ist (siehe Abb.5.6)

Abb. 5.14 zeigt ein Sequenzalignment von SoxC mit einer Auswahl der homologen Proteinsequenzen. In allen diesen Sequenzen ist die Molybdäncofaktor-Domäne und die Dimerisierungsdomäne in konservierter Form vorhanden. Die Aminosäure His116, die sich in der SoxCD-Struktur zwischen Molybdän-Cofaktor und Häm-Cofaktor befindet und möglicherweise an die Übertragung von Elektronen zwischen den beiden Cofaktoren beteiligt ist, ist in allen Sequenzen hochkonserviert, ebenso wie alle anderen Aminosäurereste, die an der Koordination des Molybdän-Cofaktors beteiligt sind. Diese Reste sind in Abb. 5.14 durch grüne Dreiecke oberhalb der Sequenzen markiert. Der Cysteinrest Cys160, der das Molybdän des Cofaktors koordiniert, wird durch ein gelbes Dreieck unterhalb der Sequenzen angezeigt.

5.7 Sequenzbasierter Vergleich: Sox-Proteine

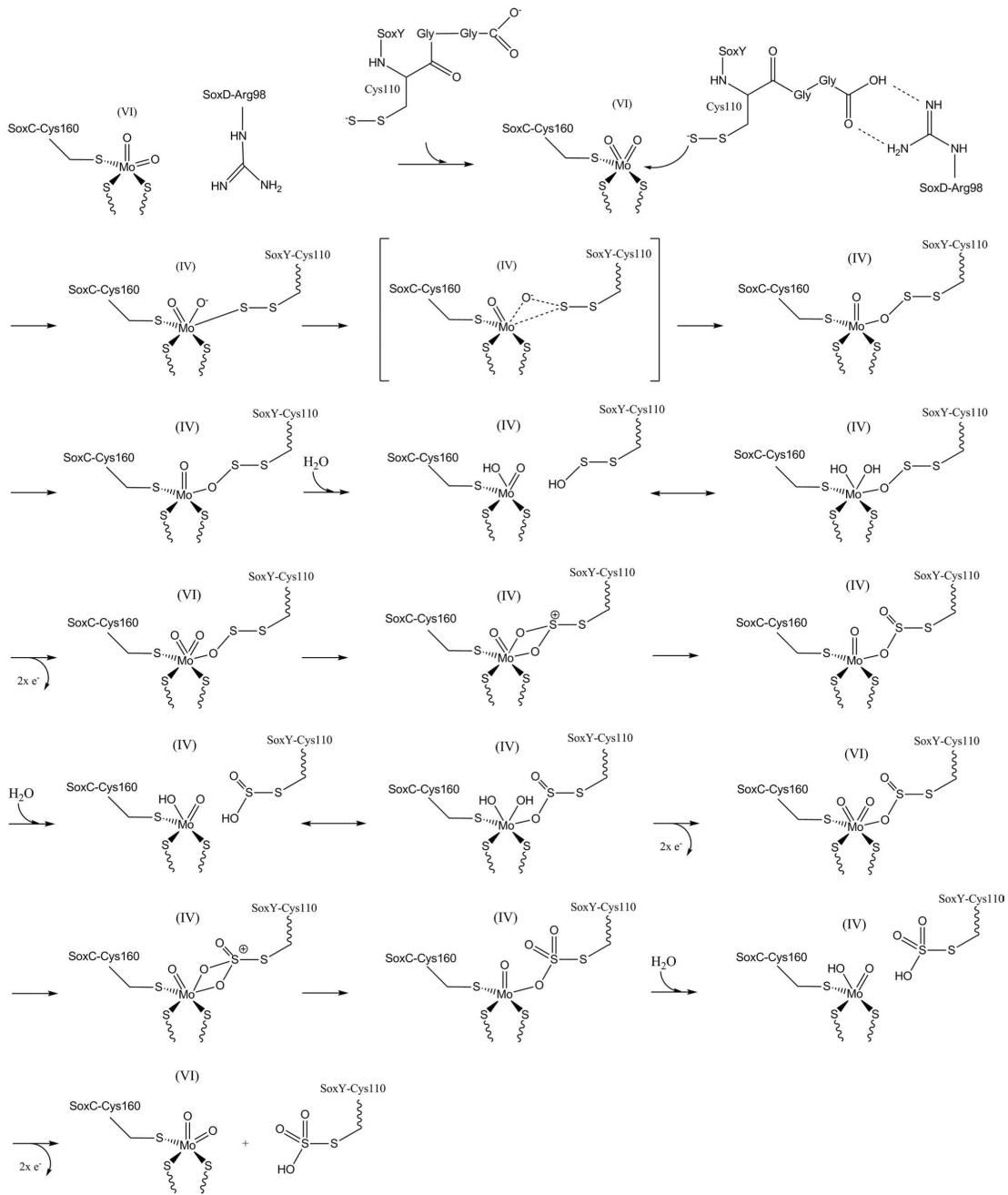


Abb. 5.13: SoxCD-Reaktionsschema.

Insgesamt ist die Homogenität unter den einzelnen SoxC-homologen Sequenzen sehr hoch. Die meisten Aminosäurenreste sind identisch, die Anzahl der variablen Bereiche ist gering. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass der Mechanismus der Schwefeloxidation durch Molybdän-Enzyme offenbar eine sehr strikte Topologie dieser Proteine voraussetzt.

SoxD. Aufgrund der ubiquitären Cytochrom-Faltung von SoxD sind in den entsprechenden Datenbanken zahlreiche homologe Sequenzen sowohl auf Protein- als auch auf Genebene zu finden, insbesondere wenn man die Suche auf die Sequenz der SoxD₁-Faltungsdomäne beschränkt. Führt man eine BLAST-Suche mit der Dihäm-Wildtyp-SoxD-Sequenz durch, erhält man als Ergebnis 100 homologe Proteinsequenzen mit einer Sequenzabdeckung von 100 % bis 69 %. 39 dieser Ergebnissequenzen sind als SoxD-Proteine verschiedener Organismen bezeichnet.

Abb. 5.15 zeigt ein Sequenzalignment einer Auswahl dieser homologen Sequenzen. Ähnlich wie bei den SoxC-Homologen sind zahlreiche Reste innerhalb der Cytochrom-Domänen der untersuchten Sequenzen identisch. Zwischen den beiden Cytochrom-Domänen besteht eine gewisse Variabilität.

Aufgrund der Kristallstruktur von SoxCD₁ wurde die Seitenkette des Argininrestes 98, die den Eingang zu dem Substratbindetrichter des SoxCD₁-Proteins blockiert, als potentieller Wechselwirkungspartner des „*Swinging Arms*“ des Transportproteins SoxY interpretiert. Aufgrund dessen wurde interpretiert, dass der C-Terminus des Transportproteins SoxY in Wechselwirkung mit der positiven Ladung des Arginins tritt, um so den Substrattrichter zu öffnen, was die hohe Substratspezifität von SoxCD erklärt. An dieser Stelle befindet sich allerdings in der Mehrzahl der Sequenzen ein Aspartatrest anstelle von Arginin, was auch im Sequenzalignment, das nur eine Auswahl der möglichen Sequenzen repräsentiert, zu erkennen ist (siehe Abb. 5.15).

Hier liegt der Schluss nahe, dass bei Proteinen mit einem Aspartatrest an der Position 98 die Art der „*Swinging Arm*“-Bindung geändert ist im Vergleich mit dem *Paracoccus pantotrophus*-SoxCD-Protein. Eine andere Möglichkeit ist, dass in diesen Organismen ein positiv geladener Aminosäurenrest, z.B. ein Lysin oder Arginin von SoxC die Funktion des SoxD-Arg98 übernimmt. In einer ersten Homologiemodellierung des SoxC-Proteins

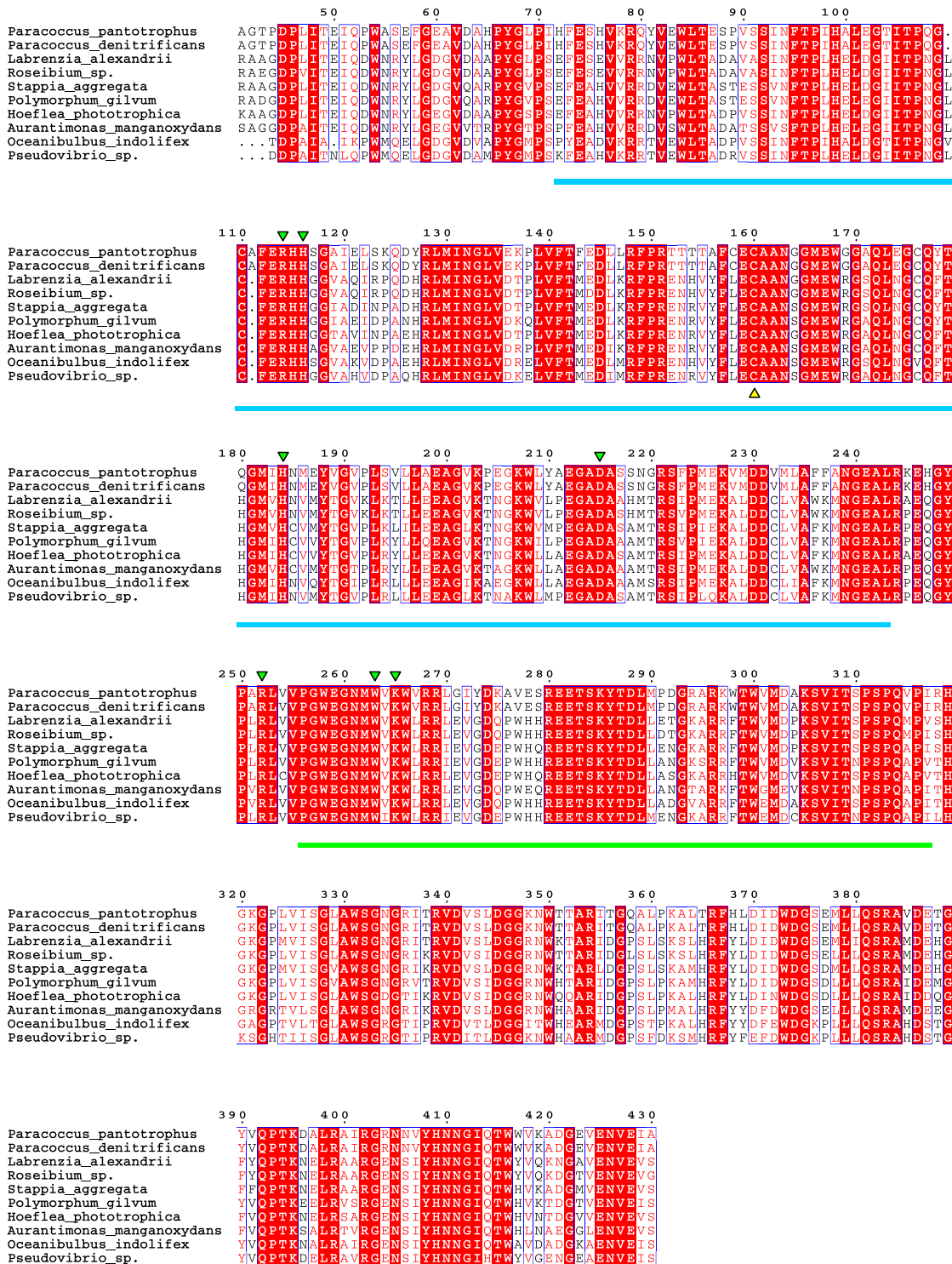


Abb. 5.14: Sequenzbasiertes Alignment: *Paracoccus pantotrophus*-SoxC und eine Auswahl homologer bakterieller Proteinsequenzen. Die homologen Sequenzen wurden mit BLAST(Camacho *et al.*, 2009) identifiziert, das Sequenz-basierte Alignment einer Auswahl der homologen Sequenzen wurde mit Clustalw (Chenna *et al.*, 2003) durchgeführt. Das endgültige Bild wurde mit ESPrnt (Gouet *et al.*, 2003) erstellt. Für die Signifikanz der Ähnlichkeiten (similarity score) wurden die Einstellungen 0.7 0.8 R verwendet. Identische Aminosäurereste (similarity score > 0.7) sind in weißer Schrift auf rotem Hintergrund dargestellt, ähnliche Reste (similarity score < 0.7) durch rote Schrift in blauer Umrandung. Die Nummerierung entspricht der SoxC-Sequenz. Reste, die den Molybdän-Cofaktor koordinieren, sind durch ein blaues Dreieck oberhalb der Sequenzen angezeigt; der Cysteinrest, der Bestandteil des Sulfitoxidase-Molybdäncofaktor ist durch ein gelbes Dreieck unterhalb der Sequenz markiert. Der blaue Balken markiert den Bereich der Molybdän-bindenden Domäne, der grüne Balken zeigt die Dimerisierungsdomäne an.

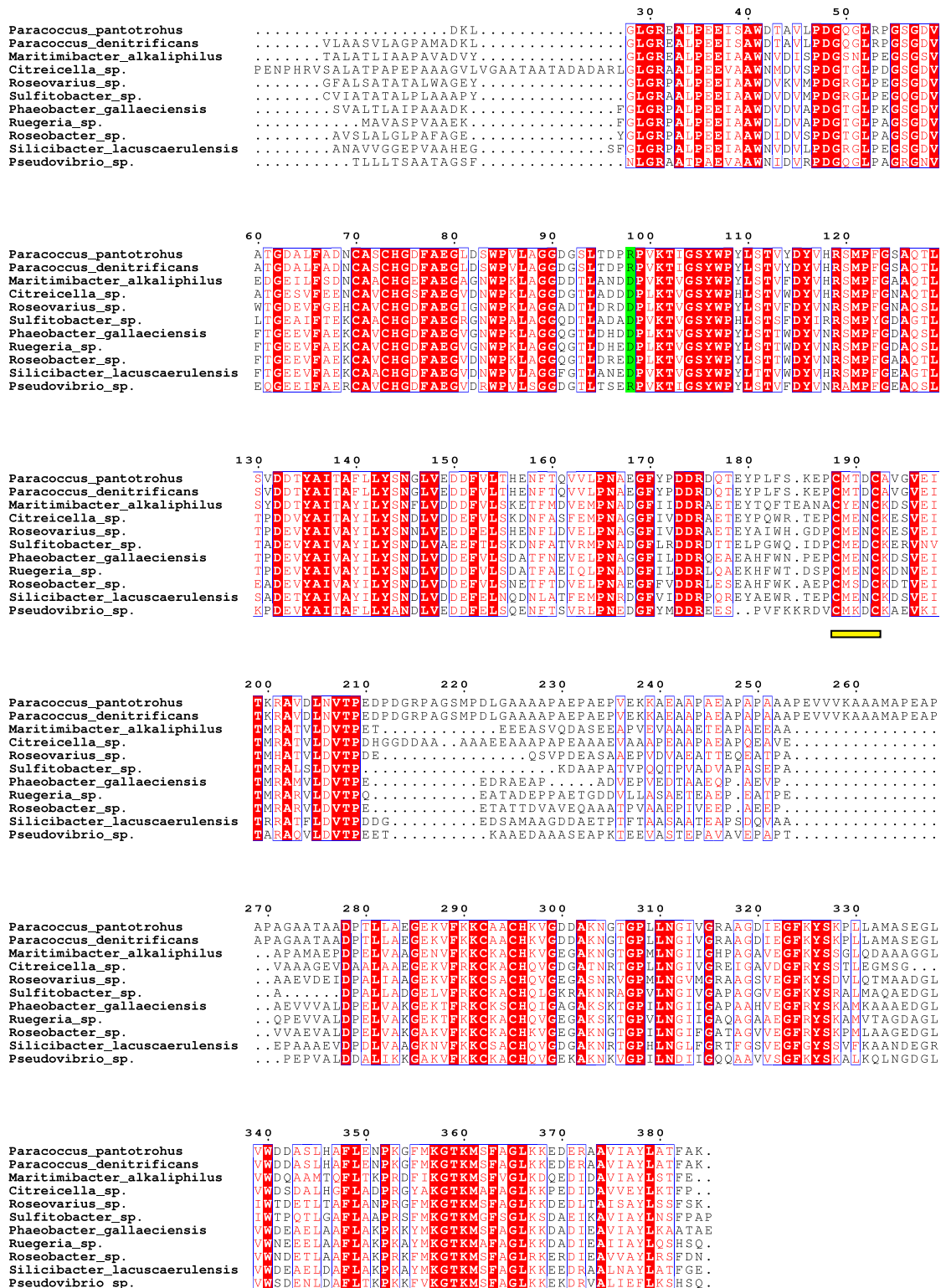


Abb. 5.15: Sequenzbasiertes Alignment: *Paracoccus pantotrophus*-SoxD und eine Auswahl SoxD-Proteinsequenzen. Die homologen Sequenzen wurden mit BLAST (Camacho *et al.*, 2009) identifiziert, das Sequenz-basierte Alignment einer Auswahl der homologen Sequenzen wurde mit Clustalw (Chenna *et al.*, 2003) durchgeführt. Das endgültige Bild wurde mit ESPrnt (Gouet *et al.*, 2003) erstellt. Für die Signifikanz der Ähnlichkeiten (*similarity score*) wurden die Einstellungen 0.7 0.8 R verwendet. Identische Aminosäurereste (*similarity score* > 0.7) sind in weißer Schrift auf rotem Hintergrund dargestellt, ähnliche Reste (*similarity score* < 0.7) durch rote Schrift in blauer Umrandung. Die Nummerierung entspricht der *Paracoccus pantotrophus*-SoxD-Sequenz. Die Homologen der Argininseitenkette 98 sind grün unterlegt. Das Disulfidbrückenmotiv CMTDC ist mit einem gelben Balken unterhalb der Sequenzen markiert.

von *Roseobacter spec.* mit SWISS-MODEL (Kiefer *et al.*, 2009) konnte allerdings kein Hinweis für die Richtigkeit dieser These gefunden werden.

Da die meisten dieser Proteine nicht biochemisch charakterisiert sind, kann hierüber keine definitive Aussage getroffen werden. Naheliegend wäre, dass die jeweiligen Organismen kein SoxYZ besitzen, da die durch das Aspartat bestimmte offenere Topologie des Substrattrichters die Bindung von freiem Schwefelsubstrat erlaubt. Diese Annahme kann so nicht bestätigt werden, da zumindest die Organismen, deren SoxD-Proteine in Abb. 5.15 gezeigt sind, auch SoxYZ-Proteine besitzen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass SoxYZ-Proteine der jeweiligen Organismen einen „Swinging Arm“ besitzen, der der jeweils spezifischen Substratrichter-Topologie des zugehörigen SoxCD-Komplexes angepasst ist. Es ist bekannt, dass SoxY-Sequenzen existieren, deren C-Terminus auf GGCG endet, die also um eine Aminosäure kürzer sind im Vergleich zu dem *Paracoccus pantotrophus*-SoxY. Ein Alignment solcher verkürzter SoxY-Aminosäuresequenzen ist in Abb. 5.17 gezeigt. Die weitaus überwiegende Anzahl der bekannten SoxY-Sequenzen hat jedoch einen auf GGCGG endenden C-Terminus, darunter auch die der Organismen, deren SoxD-Sequenzen in Abb. 5.15 gezeigt sind (siehe Abb. 5.16). Daher kann hier keine Korrelation zwischen der Eigenschaft der Aminosäuren-Seitenkette an Position 98 und der Sequenz des SoxY-„Swinging Arm“ festgestellt werden.

Eine Möglichkeit, nähere Informationen über die Bedeutung des Aminosäurenrestes 98 zu erhalten, wäre die Untersuchung, ob der Austausch von *Paracoccus pantotrophus*-SoxD-Arginin98 zu Aspartat eine Änderung in den biochemischen Eigenschaften des SoxCD-Proteins bewirkt, ob z.B. das mutierte Protein freies Sulfit oder Thiosulfat oxidieren kann.

Während die c-terminale Häm-Domäne die typischen Eigenschaften von Cytochrom *c* aufweist, ist die Sequenz der n-terminalen Häm-Domäne spezifisch für Dihäm-Schwefeldehydrogenasen. Innerhalb dieser Domäne befindet sich das konservierte Aminosäurenmotiv CMTDC (Position 188-192, siehe Abb. 5.15), die Cysteinseitenketten dieses Motivs bilden die einzige Disulfidbrücke der SoxCD₁-Struktur. Aufgrund des Vorhandenseins von drei schwefelhaltigen Aminosäuren in diesem Motiv wurde vermutet, dass es an der Reaktion von SoxCD beteiligt ist (Bardischewsky *et al.*, 2005). Diese Vermutung kann durch die Struktur von SoxCD₁ nicht bestätigt werden. Wie in Abb. 5.18 gezeigt, beträgt der Abstand zwischen dem Eisenatom des Häm-Cofaktors von SoxD₁ und der

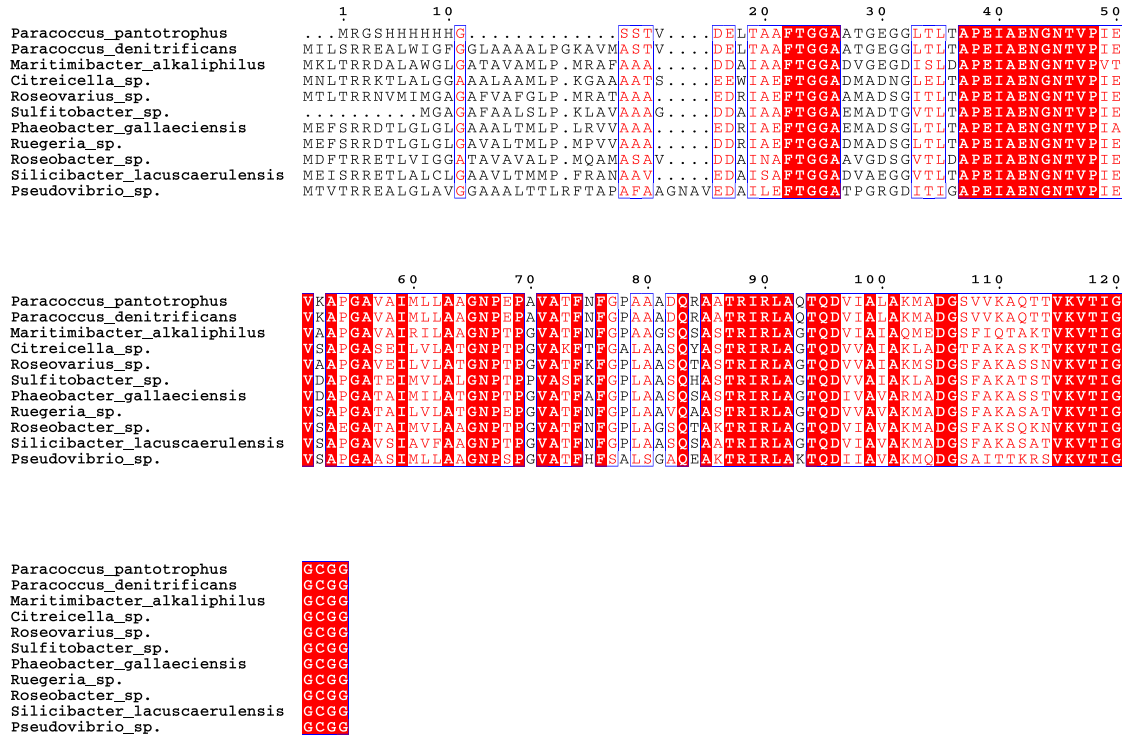


Abb. 5.16: Sequenzbasiertes Alignment: *Paracoccus pantotrophus*-SoxY und homologe Sequenzen. Die homologen Sequenzen wurden mit BLAST (Camacho *et al.*, 2009) identifiziert. Das Alignment der SoxY-Sequenzen der Organismen, deren SoxD-Sequenz im Alignment in Abb. 5.15 gezeigt sind, wurden mit Clustalw (Chenna *et al.*, 2003) durchgeführt. Das endgültige Bild wurde mit ESPript (Gouet *et al.*, 2003) erstellt. Für die Signifikanz der Ähnlichkeiten (*similarity score*) wurden die Einstellungen 0.7 0.8 R verwendet. Identische Aminosäurereste (*similarity score* > 0.7) sind in weißer Schrift auf rotem Hintergrund dargestellt, ähnliche Reste (*similarity score* < 0.7) durch rote Schrift in blauer Umrandung. Die Nummerierung entspricht der *Paracoccus pantotrophus*-SoxY-Sequenz.

5.7 Sequenzbasierter Vergleich: Sox-Proteine

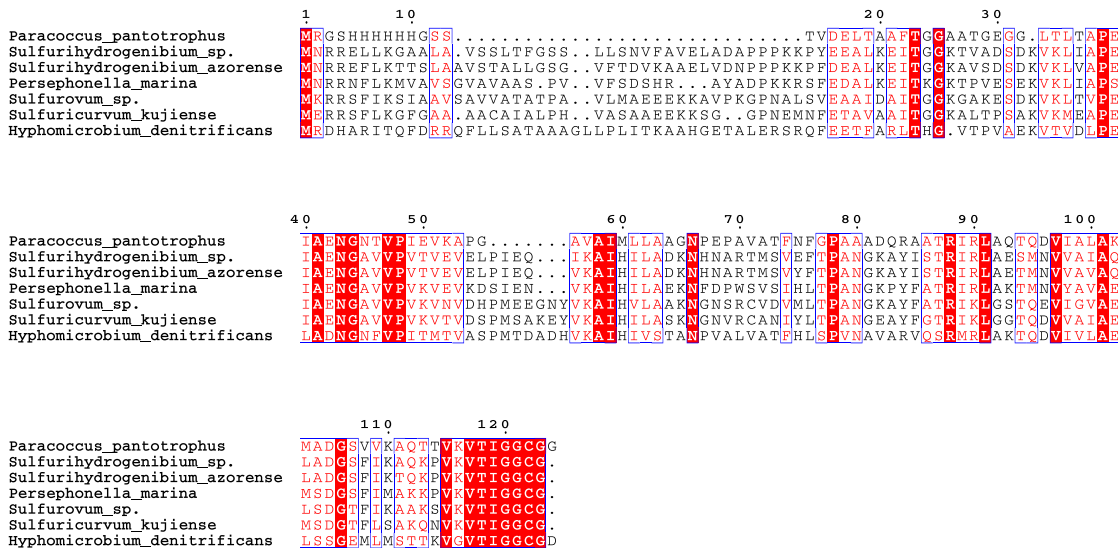


Abb. 5.17: Sequenzbasiertes Alignment: SoxY-Sequenzen mit verkürzter c-terminaler Sequenz (CCGC). Die homologen Sequenzen wurden mit BLAST (Camacho *et al.*, 2009) identifiziert, das Sequenz-basierte Alignment wurde mit Clustalw (Chenna *et al.*, 2003) durchgeführt. Das endgültige Bild wurde mit ESPript (Gouet *et al.*, 2003) erstellt. Für die Signifikanz der Ähnlichkeiten (*similarity score*) wurden die Einstellungen 0.7 0.8 R verwendet. Identische Aminosäurereste (*similarity score* > 0.7) sind in weißer Schrift auf rotem Hintergrund dargestellt, ähnliche Reste (*similarity score* < 0.7) durch rote Schrift in blauer Umrandung.

Disulfidbrücke ungefähr 50 Å. Diese Distanz macht es schwer vorstellbar, dass eine Interaktion stattfindet. Man muss hierbei allerdings beachten, dass die Kristallstruktur nur den statischen Zustand eines Proteins zeigt. In vivo kommt es durchaus zu dynamischen Bewegungen innerhalb von Proteinen, wenngleich diese sich eher über eine geringere Distanz erstrecken. Da hochkonservierte Motive in Proteinsequenzen im Allgemeinen mit einer bestimmten Funktion korreliert sind ist zu vermuten, dass dies auch für die Disulfidbrücke im Wildtyp-Protein gilt. Es ist z.B. denkbar, dass in der Quartärstruktur des Wildtyp-Proteins die fehlende c-terminale Cytochrom-Domäne so angeordnet ist, dass der Disulfidbrücke eine Funktion in der Elektronenübertragung zukommt.

Das Strukturmodell SoxCD₁ zeigt ein Konstrukt, dem im Gegensatz zum Wildtyp-SoxCD die c-terminale SoxD-Faltungsdomäne fehlt. Die Funktion der terminalen SoxD-Domäne (SoxD₂) ist nicht bekannt. Es ist möglich, dass sie *in vivo* den Kontakt zu endogenem Cytochrom *c* herstellt und somit als elektrischer Leiter dient.

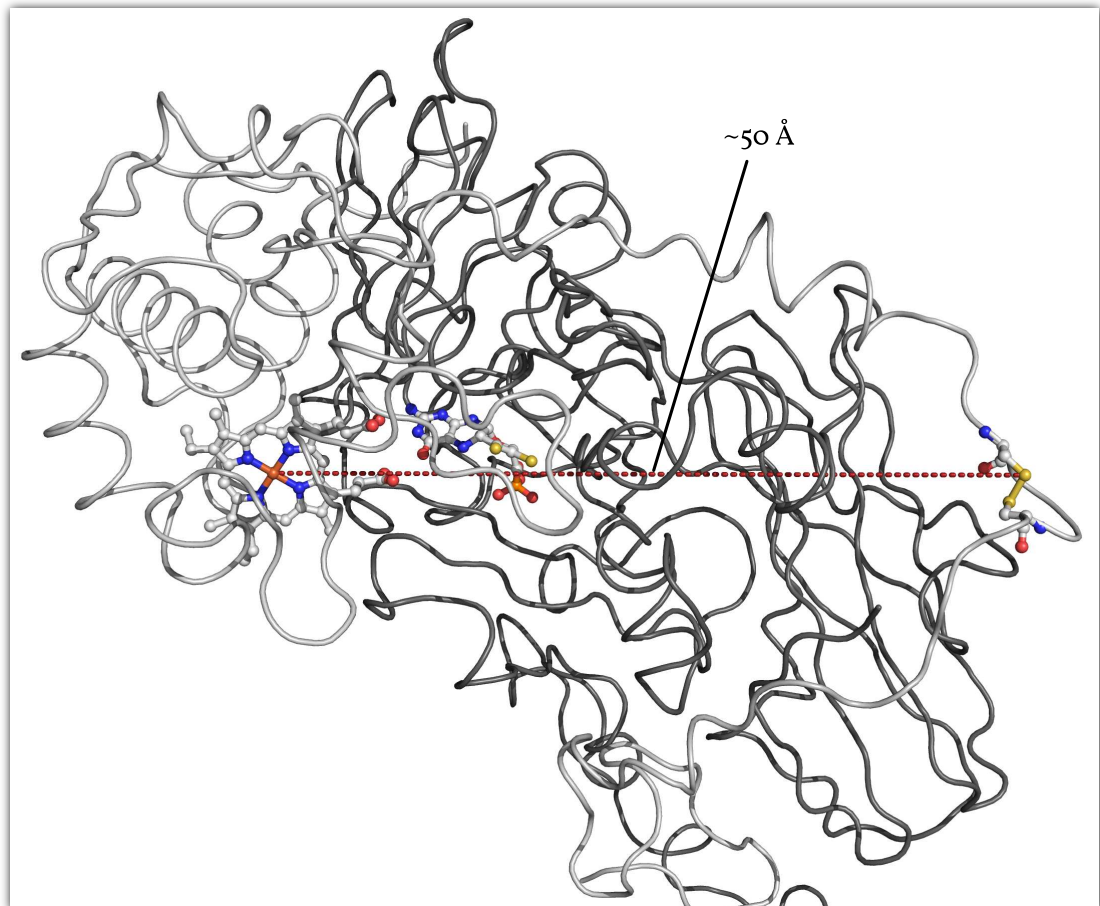


Abb. 5.18: Distanz zwischen SoxD-Disulfidbrücke und Hämcofaktor in einem SoxCD₁-Protomer. Darstellung des Verlaufs der Proteinhauptkette von SoxC (dunkelgrau) und SoxD₁ (hellgrau). Die Cofaktoren und die Cysteine der SoxD₁-Disulfidbrücke sind als Stäbchenmodelle dargestellt. Die Distanz zwischen der Disulfidbrücke und dem Eisenatom des Häm-Cofaktors ist als rote gestrichelte Linie dargestellt.

5.8 Zusammenfassung, Ausblick

Mit der Aufklärung der Kristallstruktur von SoxCD₁ sind alle Proteine des Thiosulfat-Oxidationszyklus von *Paracoccus pantotrophus* strukturell charakterisiert. Die SoxCD₁-Struktur dient als Grundlage für ein Reaktionsschema, das die Oxidation von SoxY-Cys110-Persulfid zu SoxY-Cys110-*S*-Sulfonat beschreibt. Bei dieser Oxidation werden sechs Elektronen gewonnen. Voraussetzung für das Stattfinden dieser Reaktion ist, dass das c-terminale „*Swinging Arm*“-Peptid von SoxY in den Substrattrichter von SoxCD₁ gelangt, indem der C-Terminus mit Arg98 von SoxD wechselwirkt. Dieser Befund, der in der vorliegenden Arbeit auf einer relativ einfachen Modellierung beruht, könnte durch die Cokristallisation von SoxCD₁ mit dem chemisch synthetisiert „*Swinging Arm*“-Peptid von SoxY bestätigt werden. Zum Nachweis der Bedeutung der Aminosäureseitenkette Arg98 von SoxD und anderer Reste im Bereich des Substrattrichters könnte eine Mutation zu einer anderen Aminosäure, wie z.B. Asparagin, das in homologen Proteinen an dieser Position gefunden wurde, durchgeführt werden. Mit biochemischen Methoden könnte überprüft werden, ob die Substratspezifität von SoxCD so verändert werden kann, dass z.B. freies Sulfit umgesetzt wird. Die Aminosäureseitenkette His116 von SoxC könnte durch einen anderen Rest, z.B. Alanin, ausgetauscht werden, um Erkenntnisse über ihre Bedeutung für den Elektronentransfer zwischen Molybdäncofaktor und Hämgruppe zu gewinnen. Aufgrund der großen Anzahl homologer Gen- und Proteinsequenzen könnte der Thiosulfat-Oxidationszyklus von *Paracoccus pantotrophus* ein Modellsystem für prokaryotische Thiosulfatoxidation darstellen.

Literatur

- Adams, P. D. *et al.* (2010). „PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, S. 213–221.
- Akazaki, H. *et al.* (2008). „Cloning, expression and purification of cytochrome c(6) from the brown alga *Hizikia fusiformis* and complete X-ray diffraction analysis of the structure“. In: *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64, S. 674–680.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman (1990). „Basic local alignment search tool“. In: *J. Mol. Biol.* 215, S. 403–410.
- Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp und T. Schwede (2006). „The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling“. In: *Bioinformatics* 22, S. 195–201.
- Arnold, K., F. Kiefer, J. Kopp, J. N. Battey, M. Podvinec, J. D. Westbrook, H. M. Berman, L. Bordoli und T. Schwede (2009). „The Protein Model Portal“. In: *J. Struct. Funct. Genomics* 10, S. 1–8.
- Attwood, P. V. (1995). „The structure and the mechanism of action of pyruvate carboxylase“. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27, S. 231–249.
- Bamford, V. A., S. Bruno, T. Rasmussen, C. Appia-Ayme, M. R. Cheesman, B. C. Berks und A. M. Hemmings (2002). „Structural basis for the oxidation of thiosulfate by a sulfur cycle enzyme“. In: *EMBO J.* 21, S. 5599–5610.
- Banci, Lucia, I. Bertini, G. Quacquarelli, Olaf Walter, Antonio Díaz, Manuel Hervás und Miguel A. de la Rosa (1996). „The solution structure of cytochrome c 6 from the green alga *Monoraphidium braunii*“. In: *J. Biol. Inorg. Chem* 1 (4), S. 330–340.
- Bardischewsky, F. und C. G. Friedrich (2001). „Identification of ccdA in *Paracoccus pantotrophus* GB17: disruption of ccdA causes complete deficiency in c-type cytochromes“. In: *J. Bacteriol.* 183, S. 257–263.
- Bardischewsky, F., A. Quentmeier, D. Rother, P. Hellwig, S. Kostka und C. G. Friedrich (2005). „Sulfur dehydrogenase of *Paracoccus pantotrophus*: the heme-2 domain of

- the molybdoprotein cytochrome c complex is dispensable for catalytic activity“. In: *Biochemistry* 44, S. 7024–7034.
- Battelli, M. G. und E. Lorenzoni (1982). „Purification and properties of a new glutathione-dependent thiol:disulphide oxidoreductase from rat liver“. In: *Biochem. J.* 207, S. 133–138.
- Battye, T. G., L. Kontogiannis, O. Johnson, H. R. Powell und A. G. Leslie (2011). „iMOS-FLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, S. 271–281.
- Beneš, Petr *et al.*
- Berks, B. C., S. J. Ferguson, J. W. Moir und D. J. Richardson (1995). „Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions“. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1232, S. 97–173.
- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov und P. E. Bourne (2000). „The Protein Data Bank“. In: *Nucleic Acids Res.* 28, S. 235–242.
- Bevers, L. E., P. L. Hagedoorn, J. A. Santamaria-Araujo, A. Magalon, W. R. Hagen und G. Schwarz (2008). „Function of MoaB proteins in the biosynthesis of the molybdenum and tungsten cofactors“. In: *Biochemistry* 47, S. 949–956.
- Blake, C. C., R. H. Fenn, A. C. North, D. C. Phillips und R. J. Poljak (1962). „Structure of lysozyme. A Fourier map of the electron density at 6 angstrom resolution obtained by x-ray diffraction“. In: *Nature* 196, S. 1173–1176.
- Bosron, W. F., T. K. Li, W. P. Däfeldecker und B. L. Vallee (1979). „Human liver pi-alcohol dehydrogenase: kinetic and molecular properties“. In: *Biochemistry* 18, S. 1101–1105.
- Brunger, A. T. (1992). „Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures“. In: *Nature* 355, S. 472–475.
- Brunger, A. T. *et al.* (1998). „NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54, S. 905–921.
- Camacho, C., G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer und T. L. Madden (2009). „BLAST+: architecture and applications“. In: *BMC Bioinformatics* 10, S. 421.
- Cao, H., J. M. Pauff und R. Hille (2010). „Substrate orientation and catalytic specificity in the action of xanthine oxidase: the sequential hydroxylation of hypoxanthine to uric acid“. In: *J. Biol. Chem.* 285, S. 28044–28053.
- CCP4 (1994). „The CCP4 suite: programs for protein crystallography“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, S. 760–763.

- Chan, D. I. und H. J. Vogel (2010). „Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein“. In: *Biochem. J.* 430, S. 1–19.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins und J. D. Thompson (2003). „Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs“. In: *Nucleic Acids Res.* 31, S. 3497–3500.
- Cohen, S. X., M. Ben Jelloul, F. Long, A. Vagin, P. Knipscheer, J. Lebbink, T. K. Sixma, V. S. Lamzin, G. N. Murshudov und A. Perrakis (2008). „ARP/wARP and molecular replacement: the next generation“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 64, S. 49–60.
- Cowtan, K. D. und P. Main (1996). „Phase combination and cross validation in iterated density-modification calculations“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 52, S. 43–48.
- Crane, B. R. und E. D. Getzoff (1996). „The relationship between structure and function for the sulfite reductases“. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, S. 744–756.
- Crane, B. R., L. M. Siegel und E. D. Getzoff (1997). „Structures of the siroheme- and Fe4S4-containing active center of sulfite reductase in different states of oxidation: heme activation via reduction-gated exogenous ligand exchange“. In: *Biochemistry* 36, S. 12101–12119.
- Cunha, C. A. *et al.* (2003). „Cytochrome c nitrite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. The relevance of the two calcium sites in the structure of the catalytic subunit (NrfA)“. In: *J. Biol. Chem.* 278, S. 17455–17465.
- Dambe, T., A. Quentmeier, D. Rother, C. Friedrich und A. J. Scheidig (2005). „Structure of the cytochrome complex SoxXA of *Paracoccus pantotrophus*, a heme enzyme initiating chemotrophic sulfur oxidation“. In: *J. Struct. Biol.* 152, S. 229–234.
- Diederichs, K. und P. A. Karplus (1997). „Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography“. In: *Nat. Struct. Biol.* 4, S. 269–275.
- Diez, T. A., E. S. Wurtele und B. J. Nikolau (1994). „Purification and characterization of 3-methylcrotonyl-coenzyme-A carboxylase from leaves of *Zea mays*“. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 310, S. 64–75.
- Drenth, J (2007). *Principles of Protein X-Ray Crystallography*. 2nd. Heidelberg: Springer Advanced Texts in Chemistry.
- Einsle, O., F. A. Tezcan, S. L. Andrade, B. Schmid, M. Yoshida, J. B. Howard und D. C. Rees (2002). „Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor“. In: *Science* 297, S. 1696–1700.
- Emsley, P. und K. Cowtan (2004). „Coot: model-building tools for molecular graphics“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, S. 2126–2132.

- Emsley, P., B. Lohkamp, W. G. Scott und K. Cowtan (2010). „Features and development of Coot“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, S. 486–501.
- Engh, R. A. und R. Huber (1991). „Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement“. In: *Acta Crystallogr. A* 47.4, S. 392–400.
- Evans, P. (2006). „Scaling and assessment of data quality“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, S. 72–82.
- Fischer, K., G. G. Barbier, H. J. Hecht, R. R. Mendel, W. H. Campbell und G. Schwarz (2005). „Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: crystal structures of the nitrate reductase active site“. In: *Plant Cell* 17, S. 1167–1179.
- French, S. und K. Wilson (1978). „On the treatment of negative intensity observations“. In: *Acta Crystallogr. A* 34.4, S. 517–525.
- Friedrich, C. G., D. Rother, F. Bardischewsky, A. Quentmeier und J. Fischer (2001). „Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism?“ In: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, S. 2873–2882.
- Friedrich, C. G., F. Bardischewsky, D. Rother, A. Quentmeier und J. Fischer (2005). „Prokaryotic sulfur oxidation“. In: *Curr. Opin. Microbiol.* 8, S. 253–259.
- Gasteiger, E., A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel und A. Bairoch (2003). „Expasy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis“. In: *Nucleic Acids Res.* 31, S. 3784–3788.
- Gouet, P., X. Robert und E. Courcelle (2003). „ESPrpt/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins“. In: *Nucleic Acids Res.* 31, S. 3320–3323.
- Hao, Quan (2004). „ABS: a program to determine absolute configuration and evaluate anomalous scatterer substructure“. In: *J Appl Crystallogr* 37.3, S. 498–499.
- Higgins, D. G., J. D. Thompson und T. J. Gibson (1996). „Using CLUSTAL for multiple sequence alignments“. In: *Meth. Enzymol.* 266, S. 383–402.
- Hille, R. (1994). „The reaction mechanism of oxomolybdenum enzymes“. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1184, S. 143–169.
- (2002). „Molybdenum and tungsten in biology“. In: *Trends Biochem. Sci.* 27, S. 360–367.
- Hobbs, John David und John a. Shelnutt (1995). „Conserved nonplanar heme distortions in cytochromes c“. In: *J. Protein Chem.* 14, S. 19–25.
- Holm, L. und P. Rosenstrom (2010). „Dali server: conservation mapping in 3D“. In: *Nucleic Acids Res.* 38, W545–549.
- Honig, B. und A. Nicholls (1995). „Classical electrostatics in biology and chemistry“. In: *Science* 268, S. 1144–1149.

- Huang, D. Y., A. Furukawa und Y. Ichikawa (1999). „Molecular cloning of retinal oxidase/aldehyde oxidase cDNAs from rabbit and mouse livers and functional expression of recombinant mouse retinal oxidase cDNA in *Escherichia coli*“. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 364, S. 264–272.
- Jitrapakdee, S., M. St Maurice, I. Rayment, W. W. Cleland, J. C. Wallace und P. V. Attwood (2008). „Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase“. In: *Biochem. J.* 413, S. 369–387.
- Jones, S., A. Marin und J. M. Thornton (2000). „Protein domain interfaces: characterization and comparison with oligomeric protein interfaces“. In: *Protein Eng.* 13, S. 77–82.
- Kabsch, W. (2010). „XDS“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, S. 125–132.
- Kabsch, W. und C. Sander (1983). „Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features“. In: *Biopolymers* 22, S. 2577–2637.
- Kantardjieff, K. A. und B. Rupp (2003). „Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals“. In: *Protein Sci.* 12, S. 1865–1871.
- Kappler, U. und S. Bailey (2005). „Molecular basis of intramolecular electron transfer in sulfite-oxidizing enzymes is revealed by high resolution structure of a heterodimeric complex of the catalytic molybdopterin subunit and a c-type cytochrome subunit“. In: *J. Biol. Chem.* 280, S. 24999–25007.
- Kendrew, J. C., G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff und D. C. Phillips (1958). „A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis“. In: *Nature* 181, S. 662–666.
- Kiefer, F., K. Arnold, M. Kunzli, L. Bordoli und T. Schwede (2009). „The SWISS-MODEL Repository and associated resources“. In: *Nucleic Acids Res.* 37, S. D387–392.
- Kisker, C., H. Schindelin, A. Pacheco, W. A. Wehbi, R. M. Garrett, K. V. Rajagopalan, J. H. Enemark und D. C. Rees (1997). „Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase“. In: *Cell* 91, S. 973–983.
- Kletzin, A., T. Urich, F. Muller, T. M. Bandejas und C. M. Gomes (2004). „Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic archaea“. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, S. 77–91.
- Kleywegt, G. J. (2007). „Crystallographic refinement of ligand complexes“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 63, S. 94–100.

- Krissinel, E. und K. Henrick (2007). „Inference of macromolecular assemblies from crystalline state“. In: *J. Mol. Biol.* 372, S. 774–797.
- Laemmli, U. K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“. In: *Nature* 227, S. 680–685.
- Langer, G., S. X. Cohen, V. S. Lamzin und A. Perrakis (2008). „Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7“. In: *Nat Protoc* 3, S. 1171–1179.
- Lehninger, Albert, David L. Nelson und Michael M. Cox (Juni 2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fifth Edition. W. H. Freeman.
- Letunic, I., T. Doerks und P. Bork (2009). „SMART 6: recent updates and new developments“. In: *Nucleic Acids Res.* 37, S. D229–232.
- Li, Hung-Kei, Carrie Temple, K. V. Rajagopalan und Hermann Schindelin (2000). „The 1.3 Å Crystal Structure of Rhodobacter sphaeroides Dimethyl Sulfoxide Reductase Reveals Two Distinct Molybdenum Coordination Environments“. In: *J. Am. Chem. Soc.* 122, S. 7673–7680.
- Lin, S. und J. E. Cronan (2011). „Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis“. In: *Mol Biosyst.*
- Long, F., A. A. Vagin, P. Young und G. N. Murshudov (2008). „BALBES: a molecular-replacement pipeline“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 64, S. 125–132.
- Loschi, L., S. J. Brokx, T. L. Hills, G. Zhang, M. G. Bertero, A. L. Lovering, J. H. Weiner und N. C. Strynadka (2004). „Structural and biochemical identification of a novel bacterial oxidoreductase“. In: *J. Biol. Chem.* 279, S. 50391–50400.
- Lowe, P. N. und A. F. Rowe (1985). „Aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase from trichomonas vaginalis. Identity of aspartate aminotransferase and aromatic amino acid aminotransferase“. In: *Biochem. J.* 232, S. 689–695.
- MacLeod, R.M., I. Fridovich und P. Handler (1961). „Mechanism of the factitious stimulation of biological oxidations by hypoxanthine“. In: *J. Biol. Chem.* 236, S. 1847.
- Matthews, B. W. (1968). „Solvent content of protein crystals“. In: *J. Mol. Biol.* 33, S. 491–497.
- McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni und R. J. Read (2007a). „Phaser crystallographic software“. In: *J Appl Crystallogr* 40, S. 658–674.
- (2007b). „Phaser crystallographic software“. In: *J Appl Crystallogr* 40, S. 658–674.
- Messerschmidt, A (2006). *X-Ray Crystallography of Biomacromolecules*. 1st. Weinheim: Wiley-VCH.

- Minic, Z., V. Simon, B. Penverne, F. Gaill und G. Herve (2001). „Contribution of the bacterial endosymbiont to the biosynthesis of pyrimidine nucleotides in the deep-sea tube worm *Riftia pachyptila*“. In: *J. Biol. Chem.* 276, S. 23777–23784.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin und E. J. Dodson (1997). „Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53, S. 240–255.
- Page, C. C., C. C. Moser, X. Chen und P. L. Dutton (1999). „Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction“. In: *Nature* 402, S. 47–52.
- Pahler, A., J. L. Smith und W. A. Hendrickson (1990). „A probability representation for phase information from multiwavelength anomalous dispersion“. In: *Acta Crystallogr. A* 46 (Pt 7), S. 537–540.
- Panjikar, S., V. Parthasarathy, V. S. Lamzin, M. S. Weiss und P. A. Tucker (2005). „Auto-Rickshaw: an automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61, S. 449–457.
- (2009). „On the combination of molecular replacement and single-wavelength anomalous diffraction phasing for automated structure determination“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 65, S. 1089–1097.
- Perrakis, A., T. K. Sixma, K. S. Wilson und V. S. Lamzin (1997). „wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple-refined dummy atomic models“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53, S. 448–455.
- Perutz, M. F., M. G. Rossmann, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will und A. C. North (1960). „Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å. resolution, obtained by X-ray analysis“. In: *Nature* 185, S. 416–422.
- Petrek, M., M. Otyepka, P. Banas, P. Kosinova, J. Koca und J. Damborsky (2006). „CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities“. In: *BMC Bioinformatics* 7, S. 316.
- Quentmeier, A., R. Kraft, S. Kostka, R. Klockenkamper und C. G. Friedrich (2000). „Characterization of a new type of sulfite dehydrogenase from *Paracoccus pantotrophus* GB17“. In: *Arch. Microbiol.* 173, S. 117–125.
- Rainey, F. A., D. P. Kelly, E. Stackebrandt, J. Burghardt, A. Hiraishi, Y. Katayama und A. P. Wood (1999). „A re-evaluation of the taxonomy of *Paracoccus denitrificans* and a proposal for the combination *Paracoccus pantotrophus* comb. nov.“. In: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 2, S. 645–651.

- Ravelli, R. B., H. K. Leiros, B. Pan, M. Caffrey und S. McSweeney (2003). „Specific radiation damage can be used to solve macromolecular crystal structures“. In: *Structure* 11, S. 217–224.
- Reiss, J. und J. L. Johnson (2003). „Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2, and GEPH“. In: *Hum. Mutat.* 21, S. 569–576.
- Ribbe, M., D. Gadkari und O. Meyer (1997). „N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase“. In: *J. Biol. Chem.* 272, S. 26627–26633.
- Rocchia, W., S. Sridharan, A. Nicholls, E. Alexov, A. Chiabrera und B. Honig (2002). „Rapid grid-based construction of the molecular surface and the use of induced surface charge to calculate reaction field energies: applications to the molecular systems and geometric objects“. In: *J Comput Chem* 23, S. 128–137.
- Rodriguez-Pombo, P., C. Perez-Cerda, B. Perez, L. R. Desviat, L. Sanchez-Pulido und M. Ugarte (2005). „Towards a model to explain the intragenic complementation in the heteromultimeric protein propionyl-CoA carboxylase“. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1740, S. 489–498.
- Rother, D., H. J. Henrich, A. Quentmeier, F. Bardischewsky und C. G. Friedrich (2001a). „Novel genes of the sox gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF, and evidence for a general sulfur-oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17“. In: *J. Bacteriol.* 183, S. 4499–4508.
- (2001b). „Novel genes of the sox gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF, and evidence for a general sulfur-oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17“. In: *J. Bacteriol.* 183, S. 4499–4508.
- Rupp, B (2009). *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*. 1st. New York: Garland Science.
- Sauve, V., S. Bruno, B. C. Berks und A. M. Hemmings (2007). „The SoxYZ complex carries sulfur cycle intermediates on a peptide swinging arm“. In: *J. Biol. Chem.* 282, S. 23194–23204.
- Sauve, V., P. Roversi, K. J. Leath, E. F. Garman, R. Antrobus, S. M. Lea und B. C. Berks (2009). „Mechanism for the hydrolysis of a sulfur-sulfur bond based on the crystal structure of the thiosulfohydrolase SoxB“. In: *J. Biol. Chem.* 284, S. 21707–21718.
- Scheer, M., A. Grote, A. Chang, I. Schomburg, C. Munaretto, M. Rother, C. Sohngen, M. Stelzer, J. Thiele und D. Schomburg (2011). „BRENDA, the enzyme information system in 2011“. In: *Nucleic Acids Res.* 39, S. D670–676.

- Schneider, T. R. und G. M. Sheldrick (2002). „Substructure solution with SHELXD“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, S. 1772–1779.
- Schnell, R., T. Sandalova, U. Hellman, Y. Lindqvist und G. Schneider (2005). „Siroheme- and [Fe4-S4]-dependent NirA from Mycobacterium tuberculosis is a sulfite reductase with a covalent Cys-Tyr bond in the active site“. In: *J. Biol. Chem.* 280, S. 27319–27328.
- Schomburg, I., A. Chang, O. Hofmann, C. Ebeling, F. Ehrentreich und D. Schomburg (2002). „BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information“. In: *Trends Biochem. Sci.* 27, S. 54–56.
- Schonfeld, D. L., R. B. Ravelli, U. Mueller und A. Skerra (2008). „The 1.8-Å crystal structure of alpha1-acid glycoprotein (Orosomucoid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin“. In: *J. Mol. Biol.* 384, S. 393–405.
- Schrader, N, K Fischer, K Theis, R Mendel, G Schwarz und C Kisker (2003). „The Crystal Structure of Plant Sulfite Oxidase Provides Insights into Sulfite Oxidation in Plants and Animals“. In: *Structure* 11.10, S. 1251–1263.
- Schrödinger, LLC (Aug. 2010). „The {PyMOL} Molecular Graphics System, Version ~1.3r1“.
- Schuermann, J. P. und J. J. Tanner (2003). „MRSAD: using anomalous dispersion from S atoms collected at Cu K α wavelength in molecular-replacement structure determination“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59, S. 1731–1736.
- Schuler, G. D., J. A. Epstein, H. Ohkawa und J. A. Kans (1996). „Entrez: molecular biology database and retrieval system“. In: *Meth. Enzymol.* 266, S. 141–162.
- Schwarz, G. und R. R. Mendel (2006). „Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes“. In: *Annu Rev Plant Biol* 57, S. 623–647.
- Schwarz, G., R. R. Mendel und M. W. Ribbe (2009). „Molybdenum cofactors, enzymes and pathways“. In: *Nature* 460, S. 839–847.
- Sheldrick, G. M. (2010). „Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, S. 479–485.
- Skubak, P., G. Murshudov und N. S. Pannu (2009). „A multivariate likelihood SIRAS function for phasing and model refinement“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 65, S. 1051–1061.
- Tanabe, T., S. Nakanishi, T. Hashimoto, H. Ogiwara, J. Nikawa und S. Numa (1981). „Acetyl-CoA carboxylase from rat liver“. In: *Meth. Enzymol.* 71 Pt C, S. 5–16.
- Terwilliger, T. C. (2000). „Maximum-likelihood density modification“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56, S. 965–972.

- Tickle, I. J., R. A. Laskowski und D. S. Moss (2000). „Rfree and the rfree ratio. II. Calculation Of the expected values and variances of cross-validation statistics in macromolecular least-squares refinement“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56, S. 442–450.
- Vagin, A. und A. Teplyakov (2000). „An approach to multi-copy search in molecular replacement“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56, S. 1622–1624.
- (2010). „Molecular replacement with MOLREP“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, S. 22–25.
- Vaguine, A. A., J. Richelle und S. J. Wodak (1999). „SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55, S. 191–205.
- Weiss, Manfred S. (2001). „Global indicators of X-ray data quality“. In: *J Appl Crystallogr.* 34.2, S. 130–135.
- Winn, M. D., M. N. Isupov und G. N. Murshudov (2001). „Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement“. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57, S. 122–133.
- Worrall, J. A., B. G. Schlarb-Ridley, T. Reda, M. J. Marcaida, R. J. Moorlen, J. Wastl, J. Hirst, D. S. Bendall, B. F. Luisi und C. J. Howe (2007). „Modulation of heme redox potential in the cytochrome c6 family“. In: *J. Am. Chem. Soc.* 129, S. 9468–9475.
- Wyatt, P. J. (1968). „Differential light scattering: a physical method for identifying living bacterial cells“. In: *Appl Opt* 7, S. 1879–1896.
- Xiang, S. und L. Tong (2008). „Crystal structures of human and *Staphylococcus aureus* pyruvate carboxylase and molecular insights into the carboxyltransfer reaction“. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, S. 295–302.
- Zander, U., A. Faust, B. U. Klink, D. de Sanctis, S. Panjikar, A. Quentmeier, F. Bardischewsky, C. G. Friedrich und A. J. Scheidig (2011). „Structural basis for the oxidation of protein-bound sulfur by the sulfur cycle molybdohemo-enzyme sulfane dehydrogenase SoxCD“. In: *J. Biol. Chem.* 286, S. 8349–8360.
- Zhang, Z. Y. (2003). „Chemical and mechanistic approaches to the study of protein tyrosine phosphatases“. In: *Acc. Chem. Res.* 36, S. 385–392.